

JANE KEZEM

MARCADORES DAS HEPATITES TIPO A e B
EM 91 PACIENTES COM ICTERÍCIA -
CORRELAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA

*Tese de Doutorado apresentada ao
Curso de Pós-graduação em Doenças
Infecciosas e Parasitárias da Fa-
culdade de Medicina da Universida-
de Federal do Rio de Janeiro.*

Rio de Janeiro, 1984

Ao Julio,
Daniela e Celso

A um amigo

Walderedo Ismael de Oliveira
que me ajudou a realizar mo
dificações importantes em mim
mesma.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho contou com a participação de algumas pessoas cuja colaboração ativa e direta constitui razão importante para nossos agradecimentos, ainda que não seja a única. Laços afetivos nos unem. Cremos que seria impossível chegar a algum resultado se não contássemos com a ajuda do Prof. Hermann Schatzmayr, Chefe do Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz, que colocou à nossa disposição o Laboratório do Setor de Hepatite para que lá pudessemos realizar as reações sorológicas. Boa parte desta tarefa devemos ao esforço e organização de Sandra Regina Rodrigues Simonetti e José Pascoal Simonetti. Numa outra etapa desta mesma tarefa contamos com toda a equipe do setor e em particular com Ana Maria C. Gaspar, Luiz Antônio C. Mercadante e Marcia Leite, que nos orientaram e nos conduziram no manuseio das técnicas empregadas em nossos estudos, introduzindo-nos naquela atividade inteiramente nova para nós. Uma menção especial devemos a Clara F.T. Yoshida, da mesma equipe, que nos ajudou inclusive na revisão do texto.

No acompanhamento dos pacientes e na coleta de material contamos com a paciência e extremada dedicação do Dr. Ralph Antônio Xavier, Auxiliar de Ensino da Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal Fluminense (UFF).

Na análise histopatológica tivemos a participação de Lélia Paiva Guedes, Professora Adjunto da Disciplina de Patologia, da UFF, nossa colega de turma e constante parceira de trabalhos científicos.

Durante a revisão bibliográfica, particularmente nos momentos em que o cansaço nos dominava, a presença cal

ma da Dr^a Isis Pinto Guimarães foi sempre alentadora para nos
sos ânimos.

Prof. José Rodrigues Coura: pouco nos falamos neste
período de desenvolvimento do nosso trabalho, ainda que estí
vêssemos sempre pr^oximos. Sua figura, no entanto, seguia nos
sos passos e se fez presente no momento necess^ário.

Professora L^êa Camillo-Coura: acompanhou-nos mais
de perto e nos fez as devidas cobranças. Incentivou-nos.

Agradecemos ainda aos Professores Luiz João Ab^{ra}ão
e Agostinho Soares da Silva da Disciplina de Gastroenterolo-
gia da UFF por nos permitirem acesso aos seus pacientes (ca
sos 120 e 130), e inclu^í-los em nossa casuística.

Foi-nos valiosa a ajuda da Sr^a Carmen Navarro Rivas
na correção do texto em português e da Sr^a Maria Nilci Mach^a
do Pedroza no trabalho datilogr^áfico.

Não podemos deixar de assinalar nossos reconheci^men-
tos aos colaboradores anônimos que convivem com os pesquisado^u
res numa troca harmônica de experiências.

Aos nossos pacientes que ignoram sua pr^opria impor-
tância e de quem somos devedores.

R E S U M O

O autor estudou 91 pacientes com hepatite nos quais investigou os marcadores da hepatite tipo A(HA) e da hepatite tipo B(HB). A análise deste perfil sorológico permitiu distribuir o total dos pacientes em 4 grupos, A, B, C e D, os quais incluem 37 casos de HA, 35 de HB, 11 nos quais nenhum marcador foi detectado e um quarto grupo constituído de 8 pacientes cuja interpretação dos marcadores foi difícil.

Realizada esta distribuição, o autor procedeu uma análise comparativa dos resultados dos diversos grupos, observando dados clínicos, bioquímicos e evolutivos. O grupo A incluía um número significativamente maior de crianças e adultos jovens quando comparado com o grupo B, no qual predominava pessoas de idade superior a 30 anos, da mesma forma que os pacientes do grupo C. Neste último, assim como no grupo D, como o número total de pacientes era muito menor, a comparação carecia de significado estatístico.

Quanto aos achados bioquímicos no grupo A, havia predomínio de pacientes com níveis de bilirrubina menores de 10 mg%, quando comparados com o grupo B. Na análise dos resultados da fosfatase alcalina ocorria o contrário: mais pacientes do grupo A tinham valores maiores de fosfatase alcalina quando comparados ao do grupo B. Estas variações foram interpretadas como resultante, em ambos os parâmetros, da influência da diferença etária nos dois grupos. No estudo comparativo das transaminases oxaloacética e pirúvica (TGO e TGP), não se observou diferença significativa entre os níveis destas enzimas nos dois grupos.

O AgHBs foi demonstrado em cortes histológicos de fígado utilizando-se a coloração pela orceína de Shikata em

dois pacientes do grupo B com hepatite crônica ativa (HCA) mas não nos pacientes com hepatite aguda. Em um paciente com hepatite crônica em cujo tecido hepático a coloração com orceína de Shikata foi positiva, a microscopia eletrônica (ME) revelou a presença de estruturas que lembravam as das partículas relacionadas ao AgHBs.

No que se refere ao processo evolutivo foi observado que a HA teve um curso mais benigno, não evoluiu para doença hepática crônica (DHC), mas nela ocorreu forma fulminante. No grupo B, a DHC não foi incomum e a mortalidade foi mais alta que no grupo A. Não houve óbito no grupo C e nenhum paciente evoluiu para DHC, embora o acompanhamento dos pacientes neste grupo tenha sido interrompido antes da cura em vários casos.

Além do estudo dos marcadores no soro e tecido hepático, o AgHBs foi pesquisado na saliva de 35 pacientes por três métodos: hemoaglutinação passiva reversa (HAPR), método imunoenzimático (ELISA) e radioimunoensaio (RIE). Apenas pelo RIE foi possível detectar nesta secreção o AgHBs, observando-se 83% de positividade entre 12 pacientes estudados.

PREFÁCIO

Nossos estudos iniciais sobre hepatite por vírus (HV) foram registrados em nossa tese de Mestrado (Kezem), apresentada à UFRJ em 1975. Àquela época já nos preocupavam as dificuldades em separar quadros clínicos como degeneração gordurosa do fígado da grávida, de certas formas de HV, visto que apenas a biópsia hepática podia definir o diagnóstico. Por extrema coincidência nos deparamos com um quadro clínico em um paciente de 5 anos de idade, proveniente do Estado do Rio de Janeiro que veio a falecer no 4º dia de internação em coma hepático (Paiva e cols., 1983). Em vida, o diagnóstico provável era hepatite fulminante, mas a necrópsia revelou um aspecto histopatológico de degeneração gorda do fígado em tudo semelhante à conhecida Febre Negra de Lábrea descrita na região Amazônica. Este fato ampliou as nossas dificuldades quanto ao diagnóstico etiológico da HV, sobretudo ao tentar separar as doenças com quadro clínico semelhantes. No Congresso de Medicina Tropical realizado em 1975 no Rio de Janeiro, participamos de uma mesa redonda onde assinalamos a necessidade de nos empenharmos em pesquisas neste tema. Naquela época a literatura médica começava a dedicar importância maior a pesquisa de antígenos e anticorpos da HV no soro e em tecido hepático. Foi quando nos deparamos com o trabalho de Shikata e cols., (1974), que introduzia a orceína aos corantes de cortes histológicos de fígado para detectar o AgHBs. Era um método simples que podia esclarecer o diagnóstico em material de biópsia e necrópsia incluído em parafina. Faltou-nos, no entanto, recursos para executar nosso plano. O tempo é um amargo inimigo do pesquisador. Em verdade, a pesquisa necessita de um tempo próprio, donde a pressa deve ser banida. Pouco depois este método entrava nas ro-

tinhas dos serviços de patologia.

Pela nossa formação clínica, ansiávamos por um método menos cruento. Estávamos mais seduzidos pelo desenvolvimento de meios de cultura e por métodos sorológicos que nos permitissem superar as dificuldades diagnósticas.

A possibilidade do emprego destes métodos nos animou a planejar um estudo que incluía a pesquisa dos marcadores das hepatites no soro e na saliva. O estudo da saliva não se completou por falta de recursos econômicos. Este foi um fator limitante para a realização de nosso plano inicial, pois a técnica de RIE que empregamos, embora de manuseio fácil, é dispendiosa, já que sua execução depende de material importado. Por esta razão, mesmo a realização do estudo sorológico, só foi possível graças ao apoio do Departamento de Virologia e Direção do Instituto Oswaldo Cruz, respectivamente sob a Chefia dos Professores Hermann Schazmayr e José Rodrigues Coura.

Após uma breve revisão de algumas publicações importantes da literatura sobre novos métodos de diagnóstico das hepatites por vírus, apresentamos a nossa experiência distribuindo os pacientes em grupos de acordo com o diagnóstico etiológico, a fim de confrontá-los entre si e discutir os nossos achados em relação ao de outros autores, chegando a conclusões que julgamos válidas.

I N D I C E

Pág.

I	-	Introdução	01
II	-	Casuística e Métodos	29
III	-	Resultados	38
IV	-	Discussão	77
V	-	Conclusões	94
VI	-	Summary	96
VII	-	Referências Bibliográficas	98

INTRODUÇÃO

A hepatite por vírus constitui ainda hoje um problema de saúde pública na medida que continua a ocorrer endemicamente e, por vezes, epidemicamente em todas as partes do mundo. Esta realidade é ainda reflexo da obscuridade que pairou durante muito tempo sobre a etiologia da doença, das as dificuldades de se cultivar os seus agentes etiológicos "in vitro" ou em animais de experimentação. Foi nas décadas de 60 a 70 que presenciamos um marcado desenvolvimento nestas linhas de pesquisa as quais traçaram um claro perfil de tais agentes e finalmente culminaram com o advento de vacinas contra dois dos três tipos de vírus melhores conhecidos como agentes causadores de hepatite: o vírus da hepatite A (VHA) e o vírus da hepatite B (VHB). A primeira delas ainda se encontra em vias de experimentação e a segunda em uso comercial, já está sendo aplicada em pessoas com alto risco de contrair HB. O desenvolvimento de testes sorológicos para HA e HB trouxe à luz o conhecimento de um terceiro tipo de hepatite viral a qual ainda hoje tem sido designada de hepatite não A, não B. Sobre sua etiologia pouco está esclarecido, mas há suspeita da existência de mais de um agente responsável.

HEPATITE TIPO A

A hepatite tipo A é uma doença de larga distribuição que ocorre em forma endêmica ou epidêmica, transmitida primariamente por via fecal-oral. Epidemias por fontes comuns devido à contaminação de alimentos e por águas contaminadas têm sido descritas.

O VÍRUS DA HEPATITE A -

O primeiro passo importante para a identificação do VHA foi dado por Deinhardt e cols., em 1967, com a transmissão do vírus ao sagui, experiência esta que foi a seguir confirmada por Holmes e cols. (1969). Este foi durante algum tempo o único modelo animal que servia à transmissão da doença. Posteriormente foi visto que os chimpanzês também eram susceptíveis, porém o sucesso efetivo da transmissão do VHA a estes animais só foi verdadeiramente obtido a partir de 1975 (Dienstag e cols., 1975; Gravelle e cols., 1975; Thornton e cols., 1977). Schulman e cols. (1976) foram capazes de demonstrar por imunomicroscopia eletrônica (IME) o antígeno da hepatite A (AgHA) nas fezes, fígado e bile durante a fase aguda da doença. Também demonstraram por microscopia eletrônica (ME) de fina secção, partículas de 27 nm no citoplasma de hepatócitos dos mesmos animais.

A técnica da IME como instrumento para visualização direta da interação vírus e anticorpo (Almeida e Waterson, 1969a) foi particularmente valiosa para a detecção do agente etiológico da HA. Foi com esta técnica que Kapikian e cols. (1972), descobriram partículas semelhantes a vírus nas fezes de indivíduos com gastroenterite aguda não baçteriana, as quais receberam a denominação de agente Norwalk e que pertenciam à classe de vírus conhecido como parvovírus. Feinstone e cols. (1973), empregaram a mesma técnica também em matéria fecal de pacientes com HA experimental. Eles identificaram então partículas de 27 nm, semelhantes a vírus e simultaneamente detectaram anticorpos contra o vírus da HA (anti-VHA) no soro dos convalescentes. Foi a primeira vez que tal experiência foi conseguida em material humano.

Em 1974, Locarnini e cols., repetiram a experiên

cia de Feinstone e cols., sendo-lhes possível observar partículas idênticas às observadas por esses autores. Eles consideraram que estas partículas semelhantes seriam, no entanto, distintas do agente Norwalk.

A primeira observação de partículas semelhantes a vírus em humanos, a partir de um surto natural de HA, que ocorreu entre estudantes universitários no Arizona, foi relatada por Gravelle e cols. (1975). Eles isolaram das fezes destas pessoas agudamente doentes partículas de 27 nm as quais denominaram de antígeno Phoenix (AgPhx). Este antígeno agregado por anticorpos contidos no soro de convalescentes de hepatite eram morfologicamente idênticos às partículas descritas por Feinstone e cols. Eles também inocularam "pool" de fezes humanas em 2 chimpanzês os quais desenvolveram hepatite e de cujas fezes identificaram o vírus inoculado. A comparação sorológica do AgPhx com a partícula de Feinstone e cols. mostrou que as últimas detectavam soroconversões para anticorpos em soros pareados de casos de hepatite dos quais o AgPhx foi isolado. Por outro lado, este mesmo antígeno (AgPhx) detectava soroconversões similares em soros pareados de voluntários inoculados com MS₁ dos quais Feinstone e cols. obtiveram suas partículas.

Outra técnica que tem sido empregada para detectar o AgHA é a imunofluorescência (IF) com a qual obteve-se êxito em demonstrar inclusive sua localização intra-hepática tanto em chimpanzês (Mathiesen e cols., 1977) quanto em saguís (Mathiesen e cols., 1978). Nestas experiências, a IF mostrou sua aparência tipicamente granular e concentrada no citoplasma de hepatócitos disseminados através do lóbulo hepático e mais tarde nas células de Kupffer, mas nunca em núcleo.

O emprego pela primeira vez do método de IF em seções de biópsias humanas foi realizado por Mathiesen e cols.

(1979). Eles verificaram que é possível demonstrar o VHA em biópsias em cerca de 2/3 dos pacientes com HA e que este vírus pode ser encontrado tão tarde quanto 3-4 semanas depois dos sintomas, isto é, quando nas fezes já não há quantidade detectável. Deduz-se disto que o vírus da HA está presente em humanos por um período mais longo do que se acreditava previamente através dos dados disponíveis sobre a excreção nas fezes. Neste caso, 1/3 dos pacientes quando admitidos no hospital, só apresentavam vírus nas fezes por um período não superior do que 1-2 semanas depois dos primeiros sintomas. Outro dado observado por aqueles autores se refere à distribuição do vírus da HA no fígado humano que é a mesma encontrada previamente em *sagulis* e chimpanzês.

NATUREZA, PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E CLASSIFICAÇÃO

As partículas semelhantes a vírus, isoladas desde Feinstone e cols., seja de fezes, fígado e bile de primatas não humanos (Provost, Wolanski e cols., 1975; Purcell e cols., 1975; Bradley e cols., 1976; Schulman e cols., 1976) e humanos (Bradley e cols., 1976) possuem características físico-químicas muito próximas. Desta forma o VHA fica caracterizado por um diâmetro de 27 nm, coeficiente de sedimentação de 160S e densidade de flutuação 1,30 a 1,44 g/cm³ em cloreto de césio. Ele possui um capsídeo rígido, sem envelope que é constituído de 4 polipeptídeos de peso molecular de 31×10^3 , 26×10^3 , 22×10^3 e 10×10^3 (Coulepis e cols., 1980; Feinstone e Moritsugu e cols., 1978). A análise do ácido nucléico mostrou um genoma linear composto por uma molécula de cadeia simples de ARN. Estas características somam reforços no sentido de classificar o VHA entre os picornavírus (Siegl a, 1978; Siegl b, 1978) mais do que entre os parvovírus, como se acreditava antes (Feinstone e cols., 1974).

O vírus é relativamente resistente à inativação

pelo calor a 60°C por 1 hora, éter e ácido, mas é inativado pelo formol 1:4000 a 37°C e pelo cloro 1 parte/milhão/30 minutos. Pode ser inativado por agentes físicos e químicos como irradiação ultravioleta, aquecimento a 100°C/60 minutos, autoclavagem a 120°C por 15/30 minutos, sendo importante na resistência do vírus a estes agentes o meio em que se encontra.

CRESCIMENTO DO VÍRUS EM CULTURA DE CÉLULAS E VACINA

Desde que Provost e Hilleman (1978) conseguiram pela primeira vez propagar o VHA em culturas de células de rim fetal de macaco Rhesus, outros autores (Frösner e cols. 1979; Flehmig 1980 e 1981) têm repetido a experiência com sucesso em outros tipos de cultura de células. Este evento representou a maior contribuição dentro da pesquisa que envolve a HA, visto que viabilizava o desenvolvimento de vacina, meta final de todos estes esforços. Ainda neste ano os mesmos autores (Provost e Hilleman, 1978b) prepararam uma vacina da cepa CR 326 do VHA purificado de fígado de sagli infectado e inativado com formaldeído e demonstraram proteção a saglis contra o vírus vivo de HA em estudo controlado. Eles consideraram a partir desta experiência que esta vacina pode provar ser igualmente efetiva na prevenção da HA no homem e, portanto, ser da maior importância no controle da doença.

Em 1982 Krugman anunciou a partir de uma comunicação do Dr. Maurice Hilleman do Merck Institute for Therapeutic Research que as experiências iniciais de imunização humana começariam em meados de 1982.

DIAGNÓSTICO DA HA

Da maior importância tem sido o desenvolvimento de técnicas para investigação diagnóstica e soropidemiológica

da HA. No entanto, a detecção do antígeno do HA (AgHA) a partir do soro e mesmo das fezes, fica dificultada pelo fato de ambos, tanto a passagem de vírus pela corrente circulatória, quanto a eliminação fecal serem fugazes e precoces em relação às manifestações clínicas.

A técnica de IME foi a primeira que permitiu a observação visual do AgHA (Feinstone e cols., 1973). A visualização neste caso é conseguida graças à interação do antígeno com um anticorpo específico conhecido. Trata-se de uma técnica valiosa, porém que perde em importância prática por ser dispendiosa, demorada e exigir um microscopista experiente.

Através de estudos experimentais em animais e no homem tem-se observado que a positividade dos testes para detectar anticorpos para AgHA manifesta-se muito precocemente na fase aguda da doença. Portanto, é provável que o paciente já tenha anticorpos anti-VHA em níveis substanciais quando procura ajuda médica. Quando os anticorpos da classe IgM e IgG são dosados juntos, observa-se que os títulos começam a subir rapidamente com um pico por volta da segunda semana, mantêm-se elevados nas semanas seguintes e em seguida decrescem ainda que continuem positivos por pelo menos 10 anos. O diagnóstico de uma infecção presente ou muito recente pode ser confirmado através da demonstração da subida desses níveis, o que significa que só uma amostra positiva não define o diagnóstico (Christiansen, 1977).

Em 1973 Provost e cols. desenvolveram um teste para detecção de anticorpos neutralizantes contra VHA utilizando AgHA purificado de fígado de sagüi infectado. Estes achados de neutralização do soro foram em seguida confirmados por Holmes e cols. em 1973.

Provost e Ittelson e cols. em 1975 desenvolveram um teste de fixação do complemento (FC) para anticorpo

contra o VHA humano, empregando AgHA purificado também de fígado de sagüi. Com a mesma fonte de antígeno, o mesmo grupo de pesquisadores, desta vez encabeçado por Miller e cols. (1975) desenvolveu um teste de hemaglutinação por imunoaderência (HAIA) para detecção de anticorpos contra VHA o qual é bem mais sensível que o teste de FC. Em seguida a isto Moritsugu e cols. (1976) conseguiram purificar antígenos de espécimes fecais coletados de pacientes naturalmente infectados com o VHA. Embora esta seja mais uma fonte possível de antígeno reagente, sua detecção numa fase precoce da doença fica limitada. O teste de HAIA é bem mais sensível do que o teste de FC.

Diante do sucesso com um teste imunorradiométrico de fase sólida para detecção do Ag da HB, Hollinger e cols. (1975) consideraram que sua aplicação ao diagnóstico de HA podia ser apropriado. O método envolve o acoplamento de anticorpo não marcado a uma matriz sólida o qual reage com o AgHA contido no soro testado e posteriormente com um anticorpo radiomarcado. Segundo os autores, este método mostrou-se mais sensível que o IME. Várias modificações têm sido introduzidas para melhorar sua sensibilidade.

Purcell e Wong e cols., em 1976, desenvolveram um teste radioimunobloqueador para pesquisa de anticorpos para HA, o qual podia ser realizado com antígeno parcialmente purificado de fezes. Os testes por RIE são muito sensíveis mas têm como desvantagem a manipulação de isótopos radioativos, além de serem métodos dispendiosos e utilizarem material de vida média curta. Posteriormente, Locarnini e cols. (1978) desenvolveram uma técnica imunoenzimática (ELISA) de princípio similar e, tão sensível quanto o RIE. Ela tem como vantagens a eliminação do manuseio de substâncias radioativas e fazer uso de material de maior durabilidade.

Nestes testes, as IgG e IgM contidas nos soros dos pacientes são dosadas indistintamente, falhando portan

to em definir o diagnóstico da HA aguda. Por esta razão, pode-se proceder a uma modificação no teste de modo a se detectar estas imunoglobulinas separadamente. Esta modificação pode ser feita baseada no princípio da absorção preferencial da fração IgG do soro do paciente pela proteína A da membrana celular do Staphylococcus aureus. O que resta no soro e o mantém positivo pelo RIE será apenas IgM. Algumas limitações cercam este procedimento. Uma delas está relacionada com a presença de títulos altos de IgG que pode levar a resultados ambíguos. Isto é particularmente verdadeiro quando o soro é coletado 3-4 semanas do início da doença porque a quantidade de IgG é alta e a quantidade de proteína estafilocócica não é suficiente para absorvê-la toda (Almeida e cols., 1979), o que também pode ocorrer na presença de mieloma e fator reumatóide positivo (Roggendorf e cols., 1980).

Como em outras viroses, as imunoglobulinas da classe IgM são produzidas em quantidades detectáveis somente durante a fase aguda e de convalescência da infecção pelo vírus da HA. Assim, a detecção de anticorpos IgM específica da HA (IgM anti-VHA) mesmo em uma única amostra de soro pode ser suficiente para o diagnóstico de HA presente ou recente (Bradley e Fields e cols., 1979).

Com o RIE, método que se baseia em um componente de fase sólida coberto com AgHA, pode-se observar que os anticorpos de classe IgM alcançam a mais alta concentração entre uma e três semanas depois da icterícia. Porém, já foi detectada em soro de controle ao menos 12 meses depois da infecção em menores concentrações (Flehmig e cols., 1979). O teste mostrou-se altamente específico frente a outras viroses e não é influenciado pelo fator reumatóide, além de muito sensível para anticorpos da classe IgM para VHA. Ele pode ser realizado em um a dois dias e uma única amostra de soro do paciente é suficiente para detectar os anticorpos e desta

forma a infecção pelo VHA ser prontamente diagnosticada.

O ELISA para detecção da IgM específica é tão sensível quanto o RIE com as vantagens já comentadas quando falamos de sua aplicação para os anticorpos totais da HA.

Um outro método descrito por Yoshizawa e Itoh e cols. (1980) se baseia na detecção de anticorpos anti-VHA da classe IgA fecal que também aparecem precocemente e persistem por um tempo limitado ao redor de 4 meses. Sua presença, portanto, fala a favor de uma infecção recente. Por ser um método por IME, torna-se pouco prático para uso comum.

VÍRUS DA HEPATITE TIPO B (VHB)

O conhecimento que temos hoje sobre o VHB, incluindo o recente advento de uma vacina protetora, imunogênica, para a profilaxia da HB, começou com a descoberta do antígeno Austrália (AgAu) por Blumberg e cols., em 1965 e sua subsequente associação com a HB por Prince em 1968. Simultaneamente, estruturas morfológicas envolvidas em soros contendo tal componente antigênico foram observadas na microscopia eletrônica. Estas estruturas eram compostas de formas esfêricas e filamentosas de comprimento variável, medindo ambas 22 nm de diâmetro (Bayer e cols., 1968). Mais tarde, formas maiores, esféricas de 42 nm também foram detectadas (Dane e cols., 1970).

Já em 1970, Dane sugeria que a partícula maior, que leva o seu nome, fosse o próprio VHB. A análise desta partícula, e basicamente a partir da detecção de ácido nucleico existente nela (Jōswiak e cols., 1971), favorecia esta impressão. Complementando esta idéia, estudos posteriores (Kaplan e cols., 1973; Robinson e Greeman, 1974) demonstram que a partícula de Dane continha em seu interior uma

pequena fita circular, dupla de ADN e sua própria polimerase, porém apenas as partículas cheias e não as vazias ou as parcialmente cheias, provavelmente, continham tais elementos (Gerin e cols., 1975). Estas partículas cheias são morfolologicamente caracterizadas por uma porção central ou nuclear, circundada por um envoltório externo lipoprotéico.

A porção central corresponde ao nucleocapsídeo. Ela mede aproximadamente 27 nm e possui um componente antigênico o qual foi liberado da partícula Dane por meio de um detergente não iônico (Almeida e cols., 1971) e denominado de antígeno "core" da hepatite B (AgHBc). Pertence também à estrutura central da partícula Dane um outro componente antigênico chamado antígeno e da hepatite B (AgHBe), além do ADN e sua polimerase.

As partículas menores de 22 nm, arredondadas e filamentosas, correspondem à estrutura externa do VHB. Dele, se descreve uma estrutura antigênica, chamada antígeno de superfície da hepatite B (AgHBs), ao qual corresponde o AgAu descrito por Blumberg e cols. (1965). Segundo Gerin e cols., (1975), esta é a forma predominante, circulante no soro de portadores crônicos e, muito provavelmente, representa a capa viral proteica produzida em excesso por hepatócitos infectados. Ela não contém ADN viral, mas compartilha de determinantes antigênicos com a capa externa da partícula Dane.

O AgHBs é considerado um complexo do qual fazem parte subespecificidades e para as quais se formam anticorpos diferentes. Levene e Blumberg (1969) observaram pela primeira vez esta heterogeneidade antigênica, descrevendo uma especificidade comum a e 2 diferentes b e c. Em seguida, Le Bouvier (1971) observou reação comum a, além de outras que designou de d, x e y, diferentes dos determinantes b e c de Levene e Blumberg. Além dele, Bancroft e cols., (1972) descreveram dois determinantes antigênicos adicionais, w e r.

Deste modo ficaram definidos: o determinante co mum a e dois pares de subdeterminantes d/y e w/r (Le Bouvier e Williams, 1975). Quatro fenótipos primários de AgHBs adw, adr, ayw e ayr resultam de combinação mutuamente exclusiva dos referidos pares. Além dessas categorias básicas de subtipos existe também subtipos mistos: adyw e adywr (Basel, KS, 1976). Outras subespecificidades foram descritas, mas so bre as quais não nos deteremos. Os subtipos são de importân cia epidemiológica, já que a sua prevalência varia de acordo com a região geográfica. Uma distribuição geográfica e os aspectos epidemiológicos foram traçados em um trabalho de Couroucê (1976) onde ela inclui a nova norma de nomenclatura dos subtipos do AgHBs. Estas normas foram estabelecidas com o intuito de alcançar uma uniformidade sobre a terminologia dentro da multiplicidade dos subtipos a partir de um consenso obtido em 1975, em Paris, em um encontro internacional, onde se concluiu que as 10 categorias até então conhecidas seriam provisoriamente nomeadas pela letra P maiúscula, de Paris, seguidas pelo número da categoria. Cada designação seria seguida pela nomenclatura usada por cada autor:

P_1 ayw ₁	P_4 ayw ₄	P_7 adw ₄	P_{10} adyr
P_2 ayw ₂	P_5 ayr	P_8 adr	
P_3 ayw ₃	P_6 adw ₂	P_9 adyw	

A expressão intrahepática do antígeno da HB tem sido possível examinar pela ME, por IF e por imunoperoxidase. A princípio, dois padrões de distribuição do antígeno da HB foram reconhecidos. Um deles mostrou uma localização hepatocítica proeminente na maioria dos indivíduos enquanto no outro o AgHBs encontrava-se em outras células, não hepatocíticas (Edgington e Ritt, 1971).

Ray e Desmet (1976) verificaram que o padrão de

distribuição do antígeno era expresso diferentemente no estágio de pacientes com HB segundo os estágios evolutivos da doença. A quantidade de antígeno citoplasmático variou inversamente com a intensidade da lesão da célula hepática. Assim a quantidade abundante de AgHBs presente em nível celular e lobular caracterizaria o estado de portador, a hepatite crônica persistente (HCP) e a cirrose inativa, em cujos casos o dano celular é mínimo ou ausente. Além do mais, há nesses casos, uma gritante ausência de AgHBs localizado na membrana celular. Ao contrário, o AgHBs localizado na membrana celular é um quadro proeminente na hepatite crônica ativa (HCA), cirrose ativa e nos casos de transição entre hepatite aguda e crônica.

Gudat e cols. (1975), focalizando a expressão simultânea do antígeno de superfície e do AgHBc, viram que a localização do primeiro era exclusivamente citoplasmática, enquanto a do segundo se mostrava predominantemente intranuclear.

Estas variações na distribuição dos antígenos nos hepatócitos muito provavelmente refletem os vários estágios do seu desenvolvimento intranuclear e sua liberação. No entanto, os exatos mecanismos desses eventos permanecem desconhecidos.

PATOGÊNESES DA LESÃO HEPATOCELULAR

Para explicar a patogênese da lesão hepatocelular duas hipóteses alternativas têm sido consideradas. Uma delas aborda o efeito destrutivo por ação patogênica direta do vírus sobre o hepatócito. Contudo, o efeito citolítico do AgHBs parece improvável já que grandes quantidades dele são encontrados no estado de portador são, e menores quantidades na necrose maciça (Nowoslawski e cols., 1975; Alberti e cols., 1976; Shikata, 1978).

A outra hipótese se baseia na resposta imune do hospedeiro, seja de tipo celular ou humoral.

Tem sido amplamente aceito que a imunidade mediada por células ocorre na HB, seja como causa ou efeito da doença. Como causa da lesão hepática, a imunidade mediada por células, provavelmente, seria responsável pela eliminação do AgHBs e as lesões hepatocíticas resultado da reação imune dirigida contra o antígeno localizado na superfície da membrana (Frei e cols., 1978). A falta de associação entre a presença de anticorpos dirigidos contra o VHB e a intensidade do processo inflamatório, assim como a ocorrência de HCA com hipogamaglobulinemia têm sido usados como argumento para explicar a citotoxicidade mais como dependente da imunidade celular do que da humoral (Stobo, 1978). No entanto, a relevância da imunidade celular no processo patogênico não foi ainda definida e muitas investigações continuam a ser realizadas no sentido de esclarecê-la.

A hipótese de que o dano hepático seria resultado de uma resposta imune do hospedeiro de tipo humoral teve por base algumas evidências provenientes de diferentes observações. Neste sentido, podemos dizer que Almeida e Waterson (1969b) foram os primeiros a demonstrar visualmente a presença de complexos antígeno-anticorpo em pacientes com HB e correlacionaram a presença desses complexos com a resposta imunológica do paciente. Por outro lado, a detecção do Ag da HB associado à deposição de imunoglobulina (Ig) e complemento no tecido hepático reforçou a suspeita da implicação de imunocomplexos na patogenia da doença (Nowoslawski e cols., 1972; Kater e cols., 1973; Nowoslawski e cols., 1975; Alberti e cols., 1976; Trevisan e cols., 1979). As propriedades patogênicas aparentes destes complexos foram deduzidas por Nowoslawski e cols. (1972) a partir do padrão de localização que encontraram em células de outros órgãos que não o fígado (baço, testículos, nódulos linfáticos, medula óssea). Na

base desses achados pôde ser postulado que durante a elimi
nação imune do AgHBs, tanto na hepatite aguda quanto na crô
nica, a deposição dos imunocomplexos nas paredes dos va
sos sanguíneos conduziria ao desenvolvimento de lesões dege
nerativas de severidade variável com ou sem uma resposta in
flamatória (Nowoslawski, 1975).

ISOLAMENTO, INFECÇÃO EXPERIMENTAL E PROFILAXIA

Apesar do sucesso já alcançado em se propagar o VHB em cultura de células (Zuckerman, 1975; MacNab, 1976), as dificuldades em se pa
dronizar um sistema de cultura celular capaz de uma produção de anti
geno em grande escala, retarda o extraordinário avanço con
seguido com o desenvolvimento de uma vacina que hoje está
limitada à proteção de pessoas consideradas de alto risco de
contrair a doença. Infecções e x p e r i m e n t a i s foram
conseguidas em alguns primatas não humanos a partir de Bar
ker e cols. (1973), façanha esta que garantiu um modelo ani
mal para avaliação dos efeitos da vacina. As tentativas de
imunização ativa foram iniciadas pelo grupo de Krugman al
cançando já resultados promissores (1971a; 1973). Eles utili
zaram soro humano contendo vírus MS₂ (VHB). Este soro, previa
mente tornado não infectante pelo aquecimento a 98°C por um
minuto, mostrou-se efetivo na prevenção e atenuação da HB
em crianças expostas posteriormente a soro contendo vírus
MS₂ infectante. As vacinas atualmente em uso são preparadas
a partir de purificação de partículas de AgHBs coletadas de
plasma positivo. A primeira experiência humana foi iniciada
em 1975 depois de ter-se mostrado efetiva em chimpanzês. Es
tudado por vários pesquisadores durante 6 anos, a vacina
da HB inativa foi finalmente licenciada na França e nos EEUU,
em 1981. O processo bastante complexo envolvido na purificação do
AgHBs preparado de plasma humano torna esta primeira gera
ção de vacinas bastante cara; no entanto, se quantidades gran

des de determinantes antigênicos HBs puder ser obtido "in vitro", futuras gerações de vacinas poderão ser menos custosas (Krugman, 1982). Desta forma, como medidas profiláticas da infecção pelo VHB, temos, no momento atual, duas importantes frentes de combate. A primeira delas consiste no controle da disseminação da doença pela seleção de doadores de sangue através da realização de testes para detecção de marcadores sorológicos de HB. Por este meio, tenta-se eliminar o veículo de propagação do vírus. Como segunda medida profilática poderíamos mencionar o emprego de gama globulina específica para HB, a qual foi inicialmente experimentada por Prince e cols. (1971) e Krugman e cols. (1971b) com efeito protetor bastante razoável. O intervalo entre as injeções tanto quanto o número delas, entre outras medidas, parece ser importante na eficácia da prevenção. A terceira medida profilática refere-se à aplicação de vacina a grupos restritos de pessoas expostas ao risco de adquirir a infecção como os politransfundidos e os imunodeprimidos. São considerados de alto risco os que manipulam materiais contaminados com o VHB, os que vivem ou trabalham em instituições para retardados mentais, crianças e jovens que vivem em áreas de alto risco. Também situam-se entre estes, os toxicômanos, homossexuais masculinos ativos e prostitutas.

AgHBs EM SECREÇÕES ORGÂNICAS

O encontro de AgHBs em saliva, sêmem e urina sugeriu a possibilidade destas secreções servirem de veículo para transmissão da HB. Pelo que conhecemos de infectividade nesta doença, o encontro do antígeno de superfície não caracteriza por si mesmo o potencial de transmissão do vírus. Para isto, é necessário, pelo menos que se demonstre partículas virais completas (partículas Dane), ADN polimerase específica para HB ou mesmo anti-HBc. De outro modo, apenas a transmissão da doença através da saliva poderia demonstrar

tal condição. Isto foi conseguido em estudo experimental realizado por Bancroft e cols. (1977) e por Alter e cols. (1977). O primeiro grupo de pesquisadores conseguiu infectar macaco com saliva por via subcutânea mas não por via oral, fato que poderia estar correlacionado a título baixo de AgHBs. O segundo grupo infectou chimpanzês através de saliva e sêmem.

No "pool" de saliva usado por Bancroft e cols., o AgHBs era detectado somente por RIE. Como este método é muito sensível, possivelmente se tratava de título baixo de AgHBs, mas ele detectou partículas grandes, similares em tamanho a partícula Dane. O AgHBs era encontrado nas salivas que continham sangue oculto em altas concentrações e o AgHBs em altos títulos no soro.

RESPOSTA SOROLÓGICA AO ESTÍMULO DO AgHBs

ANTI-HBs

Ao estímulo do antígeno de superfície, o organismo responde com a formação de anticorpo ao qual chamamos de anti-HBs. O padrão do desenvolvimento do anti-HBs durante o curso de HB foi bem definido pela análise de soros pareados de pessoas com doença experimentalmente induzida (Hoofnagle e cols., 1973; Krugman e cols., 1974). Em um curso clássico de HB, o anti-HBs se segue a uma antigenemia transitória. Portanto depois do desaparecimento do AgHBs, o título de anti-HBs tende a subir bastante no período de recuperação e assim continua por 6 a 12 meses após a recuperação da hepatite (Hoofnagle e Seeff e cols., 1978). Os títulos elevados são assim característicos dos casos de antigenemia transitória. Além de ser um anticorpo tardio em relação ao início da doença, sua permanência na circulação é longa, persistindo aí por muito tempo. Já no estado de portador crônico, ao contrário, o organismo falha em produzir o anti-HBs, embora desenvolva o anti-HBc em altos títulos. Hoofnagle e Seeff e cols. conside

raram ainda dois tipos de resposta sorológica ao estímulo do AgHBs. Um deles, chamado de resposta primária, no qual o anti-HBs é detectado sem uma prévia positividade do AgHBs. O aparecimento da reatividade do anti-HBc denuncia, nesta circunstância, a presença de infecção. O segundo, denominado de resposta secundária, se caracteriza pelo aparecimento do anti-HBs, também na ausência do AgHBs, porém sem nenhuma alteração no título de anti-HBc. Por esta razão, acredita-se que esta resposta é o resultado de uma imunização pelo AgHBs em um indivíduo com anticorpo pré-existente e não resultado de uma infecção atual.

SISTEMA HBc

Em 1971, Almeida e cols., utilizando a imunomicroscopia eletrônica, descreveram um novo sistema antígeno anticorpo. Eles romperam partículas Dane purificadas intactas, liberando o componente interno por meio de tratamento com o detergente "Tween-80". A este componente liberado designaram de antígeno "core" da hepatite B (AgHBc) e demonstraram que ele é antigenicamente distinto do AgHBs. Ele representa o nucleocapsídeo do VHB e foi identificado como uma estrutura nucleoprotéica de densidade de flutuação de $1,36 \text{ g/cm}^3$. Nenhuma especificidade subtipo foi até agora demonstrada (Howard e Zuckerman, 1977). O AgHBc não é encontrado no soro circulante, mas sim no núcleo das células hepáticas (Huang, 1975; Gerberg e cols., 1976; Gudat e cols., 1975) e também no citoplasma e às vezes em ambos (Brecht e cols., 1980).

A imunofluorescência realizada em chimpanzês (Hoonagale-Michalak e cols., 1978), mostra a presença do AgHBc em cortes histológicos de fígado no início da infecção, logo depois do aparecimento do AgHBs no soro, bem antes do início dos valores elevados da transaminases e mudanças histopatológicas.

lógicas à ME. A reatividade da imunofluorescência desaparece na época do pico das transaminases e das mudanças morfológicas no fígado, mas antes do desaparecimento do AgHBs.

O anticorpo contra o AgHBc (anti-HBc) aparece 12 a 20 semanas depois da exposição ao VHB, frequentemente durante o período de antigenemia HBs, no máximo da disfunção hepática e bem antes do aparecimento de anti-HBs (Hoofnagle e cols., 1973). Seus títulos declinam gradualmente, permanecendo detectável por muitos anos, podendo persistir depois que o AgHBs desaparece (Hoofnagle e cols., 1973 e Hoofnagle, Seeff e cols., 1978). Nos indivíduos que permanecem portadores crônicos, ele é encontrado em altos títulos.

O anti-HBc pode existir sozinho ou em combinação com o AgHBs em uma amostra individual de soro. O anti-HBc em conjunto com o AgHBs pode ser encontrado no curso da doença viral, como também no estado de portador crônico. Soros positivos para anti-HBs e anti-HBc são representativos da convalescência da HB e delineiam a imunidade à reinfeção. Ao contrário do anti-HBs, cuja presença no soro pode somente denunciar exposição prévia ao VHB, o anti-HBc tem sido aceito como indicador mais sensível de replicação viral ativa ou recente (Hoofnagle e cols., 1974). Em alguns pacientes com HCA, embora o AgHBs não seja demonstrado no soro, a presença do anti-HBc, particularmente em altos títulos e com anti-HBs ausente parece refletir a replicação do VHB (Omata e cols., 1978; Hoofnagle e cols., 1974), indicando que a lesão hepática resulta da infecção com VHB (Gerber e cols., 1977; Borjes e cols., 1978; Irwin e cols., 1977; Goudeau e cols., 1978).

Brechot e cols. (1980) conseguiram demonstrar o AgHBs por IF em hepatócitos de pacientes com HCA nos quais também o anti-HBc estava ausente no soro, sugerindo da mesma forma que a etiologia da doença crônica estaria relacionada ao vírus B. Vandervelde (1978), por outro lado, considera que a presença de anti-HBc como indicador de infecção

por VHB deveria ser interpretada com cautela. Para ela, alguns casos denotam infecção prévia e podem estar associados com anti-HBs. Diante da impossibilidade de confirmar a positividade de anti-HBc isoladamente em um número de soros de pacientes estudados evolutivamente, Vandervelde considerou o achado inicial como uma reação inespecífica transitória. Por outro lado, Hoofnagle e Michalak e cols. (1978) demonstraram que unidades de sangue contendo anti-HBc na ausência de AgHBs detectável são capazes de transmitir HB a receptores de sangue. Em relação a isto, Omata e cols. (1978) inferem que a infectividade do soro de pacientes, somente com anti-HBc, pode ser considerável em casos de inoculação maciça, mas negligenciável em exposição de pequenos inóculos.

Dentre os métodos empregados para a detecção do anti-HBc, o HAIA e o RIE tem-se mostrado os mais sensíveis.

Como vimos, a resposta de anticorpos ao AgHBc em pacientes infectados com VHB tem sido claramente documentada. Além disto, alguns aspectos acerca da classe de imunoglobulinas envolvidas nestas respostas já podem ser discutidas.

Na hepatite aguda, a IgM específica para o AgHBc foi detectada por mais de 8 semanas depois do início da icterícia. Também foi encontrada de forma transitória em 2 pacientes que desenvolveram HB crônica sem icterícia inicial e em 1 dentre 13 pacientes com doença hepática crônica AgHBs positivo, mas em nenhum de 8 portadores sãos (Cohen, 1978). Estes resultados sugerem que a IgM específica para o AgHBc é formada transitoriamente em resposta à infecção primária pelo VHB mas é geralmente não detectável nos portadores de AgHBs.

Segundo Niermeijer e cols. (1978), inicialmente, ambas as classes de imunoglobulinas, IgM e IgG, estão presentes, mas a IgM anti-HBc circulante desaparece (como uma regra antes, ou simultaneamente com AgHBs) em todos os pacientes curados enquanto persiste nos pacientes com evidência

de algum grau de doença hepática crônica. Como em outras doenças virais, a presença da IgM anti-HBc provavelmente significa replicação ativa do vírus; seu desaparecimento é um sinal de prognóstico favorável e pode realmente, indicar cura. Em pacientes em fase de cura, nenhuma correlação foi encontrada entre a duração da IgM anti-HBc e do AgHBs depois dos níveis máximos de transaminases. A presença de IgM anti-HBc possivelmente delinea o período de replicação viral mais fortemente que a presença de AgHBs, cuja produção pode cessar só depois, lentamente. A IgG anti-HBc pode persistir por muitos anos depois da cura clínica de uma hepatite aguda. A sua presença na ausência de AgHBs e IgM anti-HBc indica hepatite B prévia com cura completa.

SISTEMA HBe

Magnius e Espmark (1972b) descreveram um novo sistema antígeno-anticorpo relacionado a HB. O novo elemento antigênico, distinto do AgHBs, recebeu a designação de antígeno e, sendo carregado em partículas livres, físicoquímica e sorologicamente diferentes daquele antígeno.

Posterior caracterização do antígeno e, hoje designado de antígeno e da HB (AgHBe), indicava que ele tinha peso molecular consideravelmente mais baixo do que o AgHBs e em contraste a este, não era constituído de lipoproteína como foi julgado pela sua densidade de flutuação ($1,29 \text{ g/cm}^3$), portanto não se corando com corantes lipídicos (Magnius, 1975). Seu coeficiente de sedimentação é de 12S. O AgHBe é hoje reconhecidamente mais complexo do que antes se acreditava. Além de dois componentes, antigenicamente distintos, chamados e1 e e2 anteriormente identificados (Williams e Le Bouvier, 1976), um terceiro chamado de e3 foi reconhecido (Trepo e cols., 1978; Couroucê-Pauty e Placon 1978; Murphy e cols., 1978).

Desde a descrição de AgHBe em 1972, vários relatos da associação entre este antígeno e a HB foram publicados, ainda que muitas investigações se façam necessárias, no sentido de esclarecer sua real natureza e seu papel na infecção pelo VHB.

A hipótese de Sheikh e cols. (1975) de que o AgHBe seria um produto solúvel do hepatócito infectado tornou-se inconsistente pela impossibilidade em detectar o AgHBe em pacientes com hepatite fulminante (Trepo e Robert e cols., 1976). A princípio ficou evidente a falta de identidade antigênica entre o AgHBe e o AgHBc (Takahashi e cols., 1976).

Mais recentemente Takahashi e cols. (1978) demonstraram atividade de AgHBe nas partículas Dane, mais específicamente no seu componente interno. Ficou demonstrado então que sua antigenicidade não existe na superfície dos "cores" intactos ou das partículas Dane, tendo sido liberada depois do tratamento destas partículas com Pronase e em seguida com enzima proteolítica ou SDS. Quando partículas "core" purificadas são tratadas com SDS os determinantes do AgHBs ficam expostos (Takahashi e cols., 1979). Yoshida e cols., 1979, empregando o mesmo artifício em tecido hepático, conseguiram demonstrar o AgHBe dentro do núcleo dos hepatócitos pela IF.

Diversas observações importantes, ligadas com o sistema e, incluem a relação deste sistema à infectividade do soro AgHBs positivo. Os resultados desses estudos tendem a apontar o AgHBe como um marcador de replicação ativa do VHB, e portanto, suportam sua associação com infectividade (Alberti e cols., 1978).

Os resultados observados por Okada e cols. (1976) em estudo sobre a transmissão vertical de mães portadoras assintomáticas do AgHBs, constituíram um forte argumento para esta afirmação. Neste grupo, estudado por eles, as mães transmitiam o vírus a sua prole, se elas eram AgHBe positi

vo, mas não se eram anti-e positivo.

A observação de achados discordantes neste tipo de transmissão levou (Chaudury e cols., 1977) a sugerir cautela nesta avaliação e enfatiza a necessidade de maiores esclarecimentos. Por outro lado, a infectividade do AgHBe foi observada em transmissão horizontal a qual resultou de pequenos volumes introduzidos por agulhas de injeção, incidentalmente contaminados (Alter e cols., 1976). Ainda favorável a esta interpretação foram os resultados do estudo de Shikata e cols. (1977). Com a intenção de provar a relação entre a infectividade do VHB e o sistema e, eles infectaram chimpanzês com o vírus B. Seus resultados mostraram uma sensível diferença na infectividade quando empregaram soro AgHBe positivo e soro anti-e positivo. O primeiro mostrou-se 10^8 vezes mais infeccioso do que o que continha anti-e. Em concordância com isto, o estudo realizado com portadores assintomáticos (Magnius e cols., 1975) mostrou que as unidades de sangue contendo anti-e positivo não transmitiram a hepatite aos receptores.

A análise crítica desses resultados deve incluir fatores que possam contribuir para o esclarecimento das divergências nos resultados encontrados por trabalhos que seguem a mesma linha de pesquisa. Por exemplo: a não detecção de AgHBe no soro, dito por isto negativo, pode estar ligado a menor sensibilidade do método empregado, ou se a fonte de transmissão do AgHBe proveio de outra que não aquela usada na inoculação.

Merece ser enfatizado que não apenas a presença do AgHBe ou do anti-e seria relevante no que concerne à injectividade do soro contendo AgHBs. Outros elementos são importantes tais como o número grande de partículas Dane e a atividade da ADN polimerase circulante. Por outro lado, embora não se possa falar de modo definitivo na relação do AgHBe com infectividade, é verdade que soros AgHBe positivo são

mais prováveis de conter tais elementos diretamente relacionados ao VHB do que soros AgHBe negativos (Howard e cols., 1978; Shikata e cols., 1977; Alter e cols., 1976; Tong e cols., 1977; Okada e cols., 1976).

No que se refere à correlação clínica, o AgHBe está presente na fase inicial da doença aguda, juntamente com o AgHBs e antes da elevação das transaminases (Magnius, 1975) ou um pouco mais tarde (Howard e cols., 1978) e desaparece da circulação com a cura da doença. Seu aparecimento coincide assim com o nível máximo de replicação viral, e em muitos pacientes que evoluem para doença crônica o AgHBe persiste (Norkhans, 1976). Sua frequência predominante em HCA quando comparado com HCP e portadores sãos (Sheikh e cols., 1975; Pillot, 1977; Howard e cols., 1978; Tong e cols., 1977) tem sido considerado indicativo de valor prognóstico de progressão para doença hepática crônica. Estes achados são confirmados por Norkhans e cols. (1979) que compararam 12 pacientes com hepatite aguda nos quais a doença teve curso habitual, com 9 pacientes que tiveram curso prolongado e persistência do AgHBe no soro por mais de 1 ano. Nenhum dos pacientes do primeiro grupo teve o AgHBe demonstrado por mais de 9 semanas depois do início da doença (média de 5 semanas). Isto levou os autores a afirmar que a detecção do AgHBe no soro por mais de 10 semanas, a partir do início da doença, implica num grande risco da HB progredir para doença hepática crônica.

Se por um lado a persistência do AgHBe indica um prognóstico reservado no que se refere à cronicidade, a sua ausência no soro não invalida este ponto de vista (Sheikh e cols., 1975; Perillo e cols., 1977), pois mesmo que não seja detectado, a sua demonstração no fígado é possível (Trepo, Vitvitski e cols., 1976).

A importância do anti-e também tem sido avaliada através de seu comportamento clínico. Ele está presente no

soro de pacientes com hepatite por vírus aguda e persiste naqueles que têm doença hepática crônica inativa ou são por tadores (Sherlock, 1976). Sua permanência no soro tem dura ção mais curta e titulação mais baixa quando comparado com o anti-HBs e anti-HBc. As alterações histológicas hepáticas encontradas em pacientes com anti-e são consideradas míni mas, mas a presença do anticorpo não exclui doença hepática crônica, sendo assim um marcador de pouco valor para defi nir o diagnóstico histopatológico.

A presença do AgHBs em pacientes com carcinoma primário de fígado ou a associação desta neoplasia com anti corpo e têm sugerido uma propriedade oncogênica do VHB (Oh bayashi e cols., 1972; Sherlock, 1972; Sherlock e cols., 1970). No entanto, se o vírus desempenha de fato algum papel na etiologia do câncer hepatocelular, outros fatores devem es tar associados a ele, já que somente pequena fração do to tal de portadores crônicos do vírus no mundo desenvolve cã cer primário de fígado; além disto a epidemiologia do tumor não é aquela da doença infecciosa (Kew, MC, 1978).

DIAGNÓSTICO DA HB

Hoje dispomos de uma série de testes para detec ção de antígenos e anticorpos da HB, desde a imunodifusão em agar gel (técnica de Ouchterlony), até os mais sofisticados como o RIE e o ELISA. Todos eles com uma ou outra modi ficacão podem ser empregados para a pesquisa dos diferentes componentes antigênicos. Para a pesquisa do AgHBs, dentre todos os métodos disponíveis, o de imunodifusão é o menos sensível de todos, seguindo-se de fixação do complemento (FC), contraímuno-elektroforese (CIEF) e a hemoaglutinação passiva reversa (HAPR) em ordem crescente de sensibilidade. O RIE e o ELISA são os mais sensíveis. Para a caracterização morfo lógica e identificação do antígeno de superfície, a técnica

empregada é a IME. A ME, a imunofluorescência (IF), a microscopia ótica (utilizando a coloração pela orceína de Shikata e cols., 1974) e a imunoperoxidase são empregadas para sua demonstração em tecido.

Para detecção do antígeno e anticorpo e, a imunodifusão dupla de Ouchterlony e a rheophoresis são os métodos mais específicos, porém sua sensibilidade é pobre tanto em relação ao antígeno quanto ao anticorpo (McAuliffe e Purcell, 1978). A CIEF é mais sensível que o método de ID para ambos os componentes do sistema e mas menos que a hemoaglutinação passiva (HAP), cuja sensibilidade só perde para o RIE, e para o ELISA os quais, nesta avaliação correm para lelos.

Para a detecção do anti-HBc a HAIA e o RIE são os métodos de escolha pela sensibilidade. Neste sentido eles sobrepujam a CIEF e a FC. Para a detecção do AgHBc no tecido hepático a IF é um método adequado, da mesma forma que a imunoperoxidase.

HEPATITE NÃO A, NÃO B

A despeito do desenvolvimento de testes sorológicos sensíveis e específicos nos últimos anos tanto para HA, quanto para HB, muitos casos de hepatite permanecem etiológicamente inexplicados mesmo quando outras viroses como a do vírus Epstein Barr (VEB) e vírus de inclusão citomegálica (VICM) são afastados. A designação de hepatite não A, não B (HNANB) tem sido empregada para estes casos. Até o início da década de 70 o achado de hepatite pós-transfusional em pacientes AgHB negativo (Alter e cols., 1972) era, na maioria das vezes, explicado como resultado de uma infecção pelo vírus A' ou pelo vírus B cujo diagnóstico falhava pelas

limitações dos métodos empregados para detectar o Ag da HB (Hollinger e cols., 1973; Alter e cols., 1975). Porém em 1974, Prince e cols. atribuíram a outro agente etiológico, distinto do vírus A e B e mesmo do VICM, a causa de 36 dentre 51 casos de hepatite pós-transfusional. O fato era de tal forma evidente que eles sugeriram a necessidade de se identificar um vírus (ou mais de um) de uma hepatite que eles chamaram de tipo C. Também Feinstone e cols. (1975) assim como Shirachi e cols. (1978) diante de achados semelhantes, concluíram pela existência de um novo agente etiológico responsável pela hepatite humana.

A transmissão da doença através da inoculação de soro de doadores assintomáticos a voluntários sugeriu a Hoofnagle e cols. (1977) que a HNANB estava associada a um agente transmissível e assinalava ainda a existência de estado de portador.

Da mesma forma que com os outros tipos de hepatite por vírus conhecidos, a transmissão experimental a animais foi bem sucedida. A doença se desenvolveu em chimpanzês após inoculação de plasma e soro de pacientes com formas agudas e crônicas de HNANB (Alter e cols., 1978 e Tabor e cols., 1978), confirmando assim a observação de Hoofnagle de que este tipo de hepatite parece ser devido a agente transmissível o qual pode permanecer no sangue por longo período (Alter e cols., 1978).

Uma hipótese de transmissão materno-fetal da doença foi levantada a partir da observação de anormalidades da função hepática em neonatos de mães que tiveram HNANB no terceiro trimestre da gravidez (Tong e cols., 1981).

Nos EEUU somente 5 a 10% de pacientes que desenvolvem hepatite depois de transfusão sanguínea com sangue de doadores voluntários AgHBs negativo por RIE são infectados com VHB, menos freqüentemente com VICM ou VEB e muito raramente com VHA. Assim, 90 a 95% dos casos de hepatite

ocorrendo depois de transfusão são apontados como HNANB, ainda que não se possa provar a identidade deste ou destes agentes etiológicos (Robinson, 1982). No entanto, uma fração significativa de casos não são relacionados com a transfusão sanguínea (Koff, 1982; Vilarejos e cols., 1975; Khuroo, 1980). A julgar pelas publicações a respeito, nos EEUU 25 a 50% dos casos de hepatite esporádica correspondem a HNANB. Em um hospital de São Paulo, dentre 147 casos de hepatite não B, Koff e cols. (1982) verificaram que 20% era devido a HNANB. Dentre estes, 3(10%) tiveram contato anterior com pessoas ictericas ou com hepatite e 5(17%) relataram uso de transfusão sanguínea nos 2 meses prévios ao quadro atual.

O estudo comparativo de casos de HNANB com de HA e HB tem revelado que estas formas de hepatite são clinicamente indistinguíveis em casos individuais, porém, muitas vezes, estes casos tendem a repetir características comumente vistas na HA, outras vezes na HB. Este fato tem favorecido a hipótese da existência de mais de um vírus responsável pela HNANB. A evolução para a cronicidade tem sido um achado relativamente frequente (Iwarson e cols., 1979; Mathiesen e Harot e cols., 1980; Mathiesen, Skinhøj e cols., 1980; Berman, 1979). Este é um aspecto conhecidamente relacionado com HB porém ausente na HA.

Khuroo (1980) observou, durante 4 meses, 275 pacientes com HNANB transmitida por uma fonte comum de água contaminada na Índia. Ele verificou neste grupo um comportamento clínico da doença que diferia quanto ao período de incubação, características clínicas e modo de disseminação, do que se conhece dos casos pós-transfusoriais, mas semelhantes ao da HA inclusive evolutivamente. Nenhum paciente evoluiu para forma crônica, mas 12 desenvolveram forma aguda grave, dos quais 10 morreram. Rakela e Redecker (1979) observaram que a incidência de cronicidade em um outro grupo era significativamente mais alta entre os que desenvolveram he

patite transfusional (54%) e nos que faziam uso ilícito de drogas (58%) do que entre os que não tinham fonte conhecida de infecção (20%). A HCA foi observada apenas nos que a hepatite foi pós-transfusional.

A observação de mais de um episódio de HNANB em um mesmo paciente tem sido apontada como evidência epidemiológica para a existência de mais de um agente implicado nesta doença (Galbraith e cols., 1979).

Embora não se saiba a exata incidência da letalidade na HNANB, formas fulminantes têm sido observadas (Mathiesen e Horot e cols., 1980; Mathiesen e Skinhøj e cols., 1980; Khuroo, 1980).

A tentativa de delimitar o período de incubação tem mostrado uma larga variação, desde 2 a muitas semanas, porém numa maior proporção ele parece estar contido num intervalo de 5 a 10 semanas.

A cada dia se acumulam relatos a respeito da detecção de sistema antígeno e anticorpo no soro de pacientes com HNANB (Mori e cols., 1981; Shirachi e cols., 1978) e mesmo de partículas semelhante a vírus a ME no soro e citoplasma de chimpanzês (Bradley e Cook e cols., 1979) e mesmo em soro humano (Yoshizawa e cols., 1980; Mori e cols., 1980). Estes achados, no entanto, deixam de merecer credibilidade pela impossibilidade de serem reproduzíveis em outros laboratórios. Desta forma, pode-se dizer que, até o momento, nenhum vírus ou agente infeccioso foi identificado nestes casos de HNANB. Da mesma forma, embora se suspeite da existência de mais de um agente envolvido na doença, a falta de testes sorológicos disponíveis e a não identificação do vírus impede uma confirmação definitiva.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Reunimos neste trabalho 91 pacientes com suspeita clínica inicial de hepatite por vírus, os quais foram seguidos por período de tempo variável com a evolução da doença e, algumas vezes, obedecendo a realidade do próprio paciente. Para sermos precisos, 65 pacientes voltaram às consultas até que as transaminases e bilirrubinas retornaram a seus níveis normais e 22 tinham ainda alguma alteração das bilirrubinas e/ou transaminases quando os vimos pela última vez, embora 21 fossem assintomáticos por ocasião de sua última consulta. Quatro evoluíram para o óbito, sendo 3 por hepatite fulminante e um por evolução crônica seguida de cirrose.

Todos os pacientes foram acompanhados clinicamente no Hospital Universitário Antônio Pedro da UFF e na maioria (81 casos) provinha de ambulatório. Seis outros pacientes, além dos quatro que morreram, tinham estado internados na enfermaria do mesmo hospital. As internações obedeceram a critérios evolutivos de gravidade, situação social e aplicação do caso clínico ao ensino.

Uma entrevista pessoal foi realizada, onde se utilizava um questionário que incluía contatos pessoais conhecidos com outros doentes ou possíveis exposições a substâncias tóxicas, injeções ou transfusões dentro de 6 meses precedentes à doença.

O diagnóstico de hepatite foi baseado em história epidemiológica, sintomas e sinais clínicos, além de achados laboratoriais característicos. O diagnóstico era, neste sentido, aceito quando os valores de transaminases glutâmico pirúvica (TGP) excediam de 100U Frankel Reitman-UFRRJ (2,5 x o valor normal), na ausência de outro diagnóstico clínico. Exceção era permitida nos casos suspeitos de hepatite crônica.

ca nos quais os valores desta enzima podiam ser menores. Juntamente com as transaminases, analisamos os valores das bi-lirrubinas e da fosfatase alcalina. Esta investigação bioquímica era realizada logo depois da coleta de sangue. O soro de 10 ml de sangue era congelado e estocado a -20°C para o estudo dos marcadores das hepatites A e B.

As amostras de sangue eram colhidas, sempre que possível regularmente, com intervalo de uma semana, até que obtivéssemos no mínimo 2 transaminases dentro dos níveis normais. Simultaneamente, a saliva dos pacientes era colhida e estocada a -20°C para posterior avaliação do AgHBs. Seguindo estas normas, foi possível caracterizar o diagnóstico etiológico em 72 pacientes. Trinta e sete deles tiveram HA e 35 HB. Em 11 pacientes, não havia, no soro, nenhum marcador para HA ou HB. Nos 8 restantes, os resultados foram de tal forma contraditórios que não deram margem a um diagnóstico definitivo. De acordo com estes achados organizamos então 4 grupos diferentes, os quais chamaremos de grupo A, B, C e D. A apresentação dos pacientes e sua situação clínica ou laboratorial ao término do acompanhamento podem ser observadas nas tabelas I, II, III e IV e serão melhor caracterizados no capítulo de resultados. Para tornar clara nossa casuística e facilitar a discussão apresentaremos nos sos pacientes daqui por diante sempre seguindo esta distribuição. Dezesseis biópsias hepáticas foram efetuadas por punção, com agulha de Menghini em 11 pacientes cuja evolução clínica fugia do curso habitual da doença, isto é, se prolongava ou ocorria recidiva. Além dessas biópsias dispomos também do estudo histopatológico e microscopia comum dos quatro casos que evoluíram para o ôbito. Este material foi analisado à microscopia ôtica após serem submetidos à coloração pela hematoxilina-eosina, PAS com diastase, tricrômico e reticulina de Gomori e orceína de Shikata. Esta última com a intenção de detectar o AgHBs tecidual. Com a mesma intenção as biópsias eram também analisadas à ME.

TABELA I - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DO GRUPO A DE ACORDO COM A IDADE, SEXO, COR E EVOLUÇÃO CLÍNICA

Nº PAC.	INICIAIS	IDADE	SEXO	COR	CONDIÇÕES CLÍNICO-EVOLUTIVAS AO TÉRMINO DA OBSERVAÇÃO
2	ELM	3	F	B	Curado
3	DA	7	F	P	Curado
4	IBK	12	F	B	Curado
6	APS	3	F	P	Alt. Lab. (*)
15	ARM	12	M	B	Curado
16	DFS	20	F	B	Curado
17	LA	7	F	B	Curado
18	CALM	14	M	B	Alt. Lab. (*)
19	MAL	16	F	B	Curado
20	MRO	9	M	B	Curado
26	MOR	11	M	B	Curado
27	CLM	8	M	B	Curado
31	WRS	12	M	B	Curado
34	ASB	5	F	B	Curado
35	ACS	8	M	B	Curado
36	LAC	15	M	B	Alt. Lab. (*)
37	COD	14	M	B	Curado
38	VFPS	25	M	Pd	Curado
43	CCM	11	F	Pd	Curado
39	SCS	8	F	B	Curado
41	SBC	9	M	B	Curado
49	GFM	6	F	B	Curado
45	JLMS	26	M	B	Alt. Lab. (*)
48	ROL	7	M	Pd	Curado
70	SOL	11	F	Pd	Curado
52	RS	5	M	B	Óbito
72	MSC	9	M	B	Alt. Lab. (*)
55	WCM	7	M	B	Curado
54	LRT	4	M	B	Curado
62	VCB	9	F	B	Alt. Lab. (*)
78	CNS	-	M		Curado
61	APSA	7	F	B	Curado
63	PSG	18	F	B	Curado
77	AGFO	6	F	B	Curado
107	AGS	8	M	Pd	Curado
73	MRS	12	M	P	Curado
99	RAS	7	F	Pd	Curado

(*) Alt. Lab. (Alteração laboratorial)

TABELA II - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DO GRUPO B DE ACORDO COM A IDADE, SEXO, COR E EVOLUÇÃO CLÍNICA

Nº PAC.	INICIAIS	IDADE	SEXO	COR	CONDIÇÕES CLÍNICO-EVOLUTIVAS AO TÉRMINO DA OBSERVAÇÃO
57	EPL	23	F	Pd	Curado
22	LO	20	M	B	Curado
104	PRC	29	M	B	Alt. Lab. (*)
84	ADM	8	F	Pd	Curado
13	DPS	39	F	B	Curado
1	DLS	30	F	Pd	Óbito
87	DMC	35	F	Pd	Curado
50	DSP	21	F	P	Curado
94	EMRB	23	F	B	Curado
23	EMF	38	F	B	Curado
47	IRA	28	F	B	Curado
100	IJS	28	M	B	Curado
102	JFNS	21	M	Pd	Alt. Lab. (*)
98	MFC	22	F	Pd	Curado
83	MMG	39	F	Pd	Curado
32	MCE	25	F	B	Curado
71	MLF	32	F	B	Curado
51	NSC	56	M	Pd	Alt. Lab. (*)
40	NMS	27	F	Pd	Curado
30	OMG	27	F	P	Curado
12	PMC	18	M	Pd	Alt. Lab. (*)
95	PCBN	27	M	B	Crônica
69	RSC	28	F	Pd	Curado
67	SRC	7	F	B	Curado
89	SCM	32	F	B	Curado
97	SV	26	F	B	Curado
64	VNSS	25	F	B	Curado
105	EMA	19	F	P	Alt. Lab. (*)
106	MCO	4	F	B	Alt. Lab. (*)
58	HJQ	21	M	B	Curado
88	MLS	31	F	B	Alt. Lab. (*)
92	MLCA	37	F	Pd	Alt. Lab. (*)
28	MAC	5	M	B	Óbito
120	ILH	56	F	B	Óbito (crônica)
130	MJV	19	M	B	Crônica

(*) Alt. lab. (Alteração laboratorial)

TABELA III - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DO GRUPO C
DE ACORDO COM A IDADE, SEXO, COR E EVOLU
ÇÃO CLÍNICA

Nº PAC.	INICIAIS	IDADE	SEXO	COR	CONDIÇÕES CLÍNICO-EVOLU TIVAS AO TÉRMINO DA OB SERVAÇÃO
14	VARS	20	M	B	Alt. Lab. (*)
42	MFG	60	F	P	Curado
82	MCLV	34	F	B	Curado
8	CMF	53	F	B	Curado
109	ICS	44	M	B	Alt. Lab. (*)
53	SCC	25	M	B	Alt. Lab. (*)
60	EA	27	M	Pd	Curado
44	MLBM	41	F	B	Alt. Lab. (*)
90	TAN	46	F	B	Curado
46	DBS	13	M	B	Alt. Lab. (*)
81	SR	32	F	B	Alt. Lab. (*)

(*) Alt. Lab. (Alteração laboratorial)

TABELA IV - DISTRIBUIÇÃO DOS PACIENTES DO GRUPO D
DE ACORDO COM A IDADE, SEXO, COR E EVO
LUÇÃO CLÍNICA

Nº PAC.	INICIAIS	IDADE	SEXO	COR	CONDIÇÕES CLÍNICO-EVOLU TIVAS AO TÉRMINO DA OB SERVAÇÃO
101	MCC	18	F	B	Curado
56	PS	11	M	P	Curado
96	JGS	11	M	Pd	Curado
93	JAF	10	M	B	Curado
86	MLA	20	M	B	Curado
66	FGS	18	F	B	Alt. Lab. (*)
91	ZMA	31	F	B	Curado
65	FR	4	M	B	Alt. Lab. (*)

(*) Alt. Lab. (Alteração laboratorial)

TÉCNICAS EMPREGADAS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS MARCADORES

COLORAÇÃO PELA ORCEINA

Cortes histológicos do tecido hepático incluído em paraфина foram oxidados em solução a 0,3% de permanganato de potássio em ácido sulfúrico por 5 minutos. Em seguida foram passados em solução a 1,5% de ácido oxálico até que diminuiu a intensidade da cor. Foram colocados então em solução de orceina Merck, 1g para 100 ml de álcool a 70% ajustado em pH de 1 a 2 com ácido hidrocloreídrico durante 4 horas. A diferenciação foi feita em álcool absoluto, após o que os cortes foram passados em xilol e, finalmente, montados.

TÉCNICA DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Diminutos fragmentos do tecido hepático foram fixados em solução a 4% de glutaraldeído em tampão cacodilato 0,1 molar e pós-fixado em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão. Os blocos foram desidratados em álcool e acetona e incluídos em resina Polilyte 8 001. Os cortes feitos em ultramicrotomo LKB foram corados pelo acetado de uranila e citrato de chumbo e observados no microscópio eletrônico Zeiss EM-103.

TESTES USADOS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS MARCADORES DA HB NO SORO

O AgHBs, o anti-HBs, o anti-HBc foram pesquisados através de radioimunoensaio comercial, respectivamente AUSRIA, AUSAB e CORAB (Laboratórios Abbott) no soro de todos os pacientes. Em 35 deles, o AgHBs e o anti-HBs foram pesquisados também pelo HAPR e HAP, respectivamente. Todos os tes

tes de RIE foram realizados seguindo as recomendações do fabricante.

AgHBs (AUSRIA) E ANTI-HBs (AUSAB)

O sistema AUSRIA II-125 e o AUSAB utiliza o princípio do sanduíche, técnica do RIE de fase sólida para determinar os níveis séricos ou plasmáticos do AgHBs e anti-HBs, respectivamente.

TESTE CONFIRMATÓRIO PARA O AgHBs

Para os casos de resultados inconclusivos quanto à detecção do AgHBs, utilizamos o teste de neutralização confirmatório, também da Abbott, em algumas amostras consideradas reativas para detectar possíveis reações inespecíficas. A prova consistiria em neutralização do AgHBs pelo tratamento prévio do soro com o anti-HBs. Quando havia a diferença significativa na contagem radioativa entre o soro antes e após a presença do anti-HBs, a amostra era confirmada como positiva para o AgHBs. Caso contrário, ela era considerada negativa.

ANTI-HBc (CORAB)

O teste CORAB é um radioimunoensaio competitivo no qual a anticorpos anti-HBc do soro ou plasma competem com uma quantidade constante de anti-HBc marcado com I 125 nos locais da fase sólida aderida de AgHBc. Assim, a proporção de material radioativo anti-HBc ligado à fase sólida é inversamente proporcional à concentração de anti-HBc.

ELISA (REAÇÃO IMUNOENZIMÁTICA)

Este teste foi realizado com uma possibilidade al

alternativa para demonstração sorológica do AgHBs em 23 amostras de 7 pacientes pertencentes ao grupo D que será visto mais adiante.

Utilizamos para este método, reativos produzidos no Setor de Reativos para diagnóstico de hepatite de Biomanguinhos, FIOCRUZ.

O teste é uma técnica imunoenzimática direta, usando gama globulina anti-HBs como captura, soro suspeito de conter AgHBs, mais conjugado (gama globulina anti-HBs conjugada com peroxidase, segundo Avrameas e Termynck, 1971).

ANTÍGENO E ANTICORPO E (IMUNODIFUSÃO)

A técnica empregada para a detecção do sistema e em todos os pacientes foi a da imunodifusão descrita por Magnius e Espmark (1972a), modificada.

O gel constitui de 0,9% (w/v) de agarose dissolvida em 0,01 M tris.HCl, pH 7,6 suplementada com 0,1 M de NaCl 0,02 M de EDTA. O gel continha também 2% (w/v) de Dextran 250 a 2% (w/v) de polietileno glicol 6000.

O soro foi previamente concentrado 3 vezes com Lypogel (Gelman Instruments Co., Ann Arbor, Michigan), e a placa era incubada a 37°C por 18 horas em câmara úmida.

HEMOAGLUTINAÇÃO PASSIVA REVERSA

Para o teste de hemoaglutinação passiva reversa utilizamos hemácias de carneiro ligadas à gama globulina específica para anti-HBs.

HEMOAGLUTINAÇÃO PASSIVA

Para o teste de hemoaglutinação passiva utilizamos

hemácias de carneiro ligadas com antígeno HBs purificado. Tanto os reativos para reação de HAPR como para HAP foram produzidos pelo setor de reativos para diagnóstico de hepatite, Biomanguinhos, FIOCRUZ, segundo Imai e cols. (1974).

TESTE PARA IDENTIFICAÇÃO DO MARCADOR IgM ESPECÍFICA PARA HA

Para a pesquisa da IgM específica para HA foi empregada a técnica de RIE, utilizando reagentes comerciais (HAVAB M dos laboratórios Abbott) e seguindo as instruções do fabricante.

RESULTADOS

GRUPO A

Sob a designação de grupo A incluímos todos os pacientes nos quais se detectou IgM específica para hepatite A e nos quais se podia afastar o diagnóstico de HB através do estudo dos marcadores para este tipo de hepatite. Estão incluídos neste grupo 37 pacientes. Trinta e cinco eram negativos para qualquer dos marcadores da HB. Dois apresentaram anti-HBc, fracamente positivo, como único resíduo de HB. Um deles (caso 45) era um paciente de 26 anos de idade, do qual faltavam dados na sua história que revelassem algum possível contato com o vírus B. O outro paciente (caso 77) de 6 anos de idade tinha uma história de injeção 2 meses antes do início de sua doença atual. Um paciente, dentre os 37 deste grupo, e que tinha 5 anos de idade, evoluiu para o óbito dentro de 18 dias a partir dos primeiros sintomas (caso 52).

IgM ESPECÍFICA PARA HA X TEMPO DE EVOLUÇÃO

Para facilitar a análise da IgM para HA, resolvemos escalonar os valores de cintilações por minuto, os quais foram obtidos sem diluição, em relação ao valor referência, considerando:

- a) Negativo: valores menores do que o valor referência (Valor referência obtido: 818)
- b) Fracamente positivo: valores até 2,5 x o valor referência
- c) Moderadamente positivo: 2,5 a 5 x o valor referência
- d) Fortemente positivo: acima de 5 x o valor referência

De posse deste critério, tentamos analisar os resultados da IgM específica para HA em função do tempo de evolução da doença. Em 18 pacientes prosseguimos com a pesquisa da IgM por um tempo variável de 1 a 32 semanas após a cura clínica e laboratorial da doença; em 7, a pesquisa da IgM coincidiu no tempo com a cura e em 9, a pesquisa foi interrompida antes da cura, um dos pacientes por óbito. Em 3 a IgM foi pesquisada em apenas uma amostra, sendo todas fortemente positivas.

Resultados fortemente positivos eram vistos no início da doença e nos casos em que a evolução clínica era igual ou menor que 42 dias (12 casos). Todavia 2 pacientes (casos 45 e 36) apresentaram IgM fortemente positiva em época mais tardia da doença (80º e 91º dias). O primeiro deles já tinha os níveis enzimáticos (TGO e TGP) normalizados muito antes (36º dia de evolução) e o outro simultaneamente com a dosagem da IgM (91º dia). Em outro paciente, a IgM era fortemente positiva no 42º dia de evolução. Nele, a doença progredia por um tempo superior a 52 dias, momento em que foi interrompida a observação.

Valores moderadamente positivos foram encontrados num tempo tão curto quanto 9 e 17 dias (casos 99 e 63), bem mais longo como 52 e 114 dias (casos 77 e 35).

Os valores fracamente positivos foram vistos sempre num período evolutivo mais avançado da observação, chegando mesmo a 8, 10 e 11 meses (casos 2, 15 e 35) com IgM ainda presente.

Em 4 pacientes houve negatificação da IgM. Em um deles (caso 49), a última IgM positiva foi no 48º dia, tempo que coincidia com a normalização bioquímica das transaminases e da bilirrubina. No 89º dia depois dos primeiros sintomas a IgM estava negativa. Um outro paciente (caso 61) de 7 anos de idade, já tinha a IgM negativa no 17º dia de doença. A normalização das transaminases e bilirrubinas se deu

10 dias ap^{os}. Nos outros 2 pacientes (casos 2 e 15), nos quais a IgM tornou-se negativa, isto ocorreu mais de 30 semanas ap^{os} o in^{ic}io da doen^{ca}.

PATOLOGIA EM RELAÇÃO AOS ASPECTOS CLÍNICO-EVOLUTIVOS

Quatro pacientes deste grupo (casos 2, 3, 15 e 18) foram biopsiados por apresentarem recorrência do quadro clínico e bioquímico 6 a 9 semanas a partir dos primeiros síntomas. A microscopia ótica mostrou alterações histopatol^{ogi}cas de hepatite aguda em todos. Estes achados se assemelhavam entre si pela intensidade do processo agudo, levando em consideração o tempo de evolução a partir do in^{ic}io da doen^{ca} (10 a 15 semanas). A necrose hepatoc^{it}ica era ainda visivelmente presente com abundante infiltração linfocit^{aria} e eosinofílica nestas áreas e nos espaços-porta (Fig. 1, 2 e 3). Este aspecto de lesão aguda era de tal forma intenso nas áreas lobular e portal em um paciente (caso 2) que a princípio suspeitamos de um processo evolutivo crônico. Por esta razão o paciente foi submetido a outra bi^{ops}ia hepática 9 meses depois e os achados não mostraram progressão daquelas lesões. A normalização das alterações bioquímicas deu num intervalo de 16 a 17 semanas em 3 destes pacientes. No 4^o paciente (caso 18) havia ainda elevação das transaminases e das bilirrubinas acima dos valores normais com 9 semanas de evolução da doen^{ca}, quando o vimos pela última vez.

O paciente (caso 52) que evoluiu para o óbito, tinha 5 anos de idade, era natural de Niter^{ói}, onde residiu at^é o momento do in^{ic}io de sua doen^{ca} atual. Ele apresentou um quadro clínico típico de hepatite aguda o qual evoluiu com manifestações nerol^{ógicas}, hemorrágicas e óbito no 18^o dia de evolução. Não havia nenhum dado epidemiol^{óg}ico para hepatite t^{óx}ica ou infecciosa. Na tabela V pode-se ver alguns dados bioquímicos e sorol^{óg}icos deste caso.

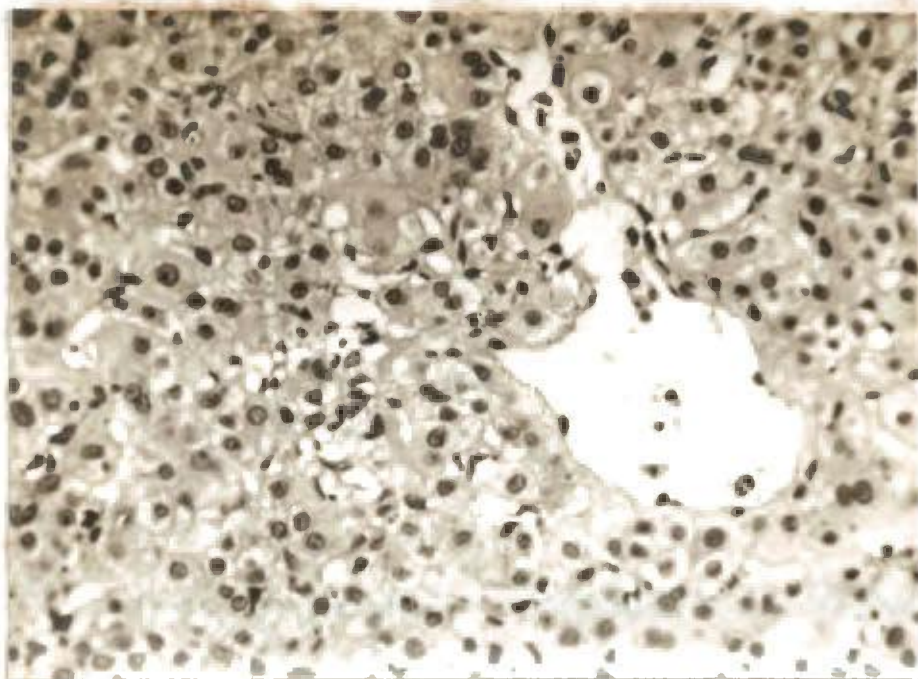


Fig.1 (caso 18) - Região centro-lobular. Pequeno foco de necrose lítica e discreto infiltrado inflamatório. Vários hepatócitos binucleados. com aspecto regenerativo (HE-360x)

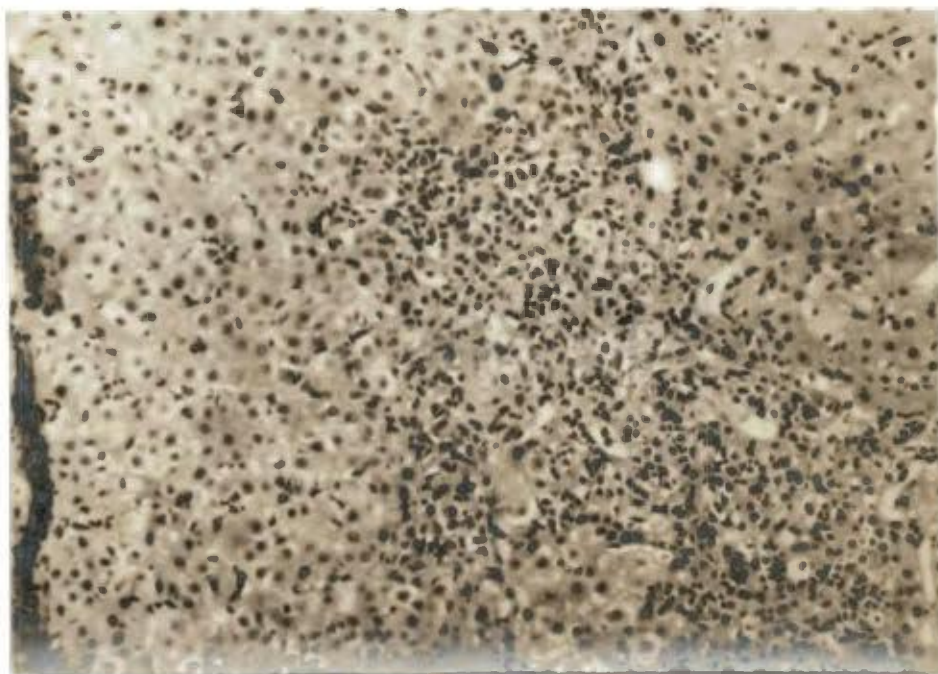


Fig.2 (caso 15) - Região centro-lobular. Área de necrose hepatocítica com acentuado afluxo inflamatório predominantemente mononuclear (HE-180x)



Fig.3 (caso 15) - Espaço portal alargado por intenso infiltrado inflamatório, predominantemente linfocitário (HE-180x)

TABELA V - DADOS BIOQUÍMICOS E PERFIL SOROLÓGICO DO PACIENTE COM HEPATITE FULMINANTE (CASO 52). GRUPO A

DATA	TGO UFR	TGP UFR	BILIRRUBI NA TOTAL mg%	BILIRRUBI NA DIRETA mg%	Ag HBs RIE HAPR	ANTI- HBs HAP	ANTI- HBc CORAB	Ag HBe ID	ANTI- HBe ID	IgM ESPECÍ FICA PARA HA
9/06/81	890	670	15.8	13.8						
20/06/81	1050	1350								
21/06/81	950	1450			neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	fort.pos.(*)
22/06/81	700	570			neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	fort.pos.(*)

(*) fort.pos. (fortemente positiva)

Na necrópsia observou-se um fígado diminuído de tamanho, pesando 250g, de consistência friável com áreas vermelho-amareladas. A microscopia ótica exibiu um quadro clássico de necrose maciça, com extensas áreas de devastação dos hepatócitos, sendo que as células hepáticas mais preservadas mostravam citoplasma volumoso, finamente vacuolado. Os espaços-porta eram alargados com moderado infiltrado de células mononucleares e discreta proliferação ductal.

A pesquisa do AgHBs em tecido hepático, pela coloração com a orceína de Shikata, foi negativa em todos os casos em que se realizou biópsia, assim como no caso de óbito.

GRUPO B

Reunimos sob a designação de grupo B, 35 pacientes nos quais a pesquisa da IgM específica para HA foi negativa e cujo estudo sorológico denunciou a presença de marcadores da HB. A análise desses resultados mostrou:

AgHBs

Vinte e três pacientes tinham AgHBs e anti-HBc simultaneamente presentes no soro desde a primeira até a última amostra. Dois pacientes dentre eles evoluíram para o ôbito. Um deles era do sexo feminino e tinha 30 anos de idade (caso 1) e o outro era masculino e tinha 5 anos (caso 28). De ambos tivemos apenas uma amostra de soro para a análise dos marcadores. O AgHBs e o anti-HBc estavam presentes em ambos, sendo que o anti-HBe também foi encontrado no primeiro paciente no 19º dia da doença. Outros 9 pacientes, nas primeiras amostras, apresentavam esta mesma distribuição dos marcadores, mas durante o período de observação houve negativação do AgHBs, com simultânea conversão para anti-HBs em quatro deles (casos 22, 47, 13, 23). Em um paciente (caso 57) o AgHBs estava ausente desde a primeira amostra, tendo sido detectado o anti-HBc assim como o anti-HBs e mais tarde o anti-HBe. Dois pacientes com HCA (casos 120 e 130) tinham AgHBs e anti-HBc positivos em uma única amostra na qual se realizou a pesquisa. O anti-HBs estava ausente em ambos. Nelas a doença hepática tinha mais de dois anos de evolução quando a pesquisa sorológica foi realizada.

ANTI-HBs

O anti-HBs foi detectado durante o período de observação em 16 pacientes deste grupo. O acompanhamento des

te anticorpo permitiu a detecção de seu aparecimento em 8 deles, quatro dos quais seguindo a negatificação do AgHBs, conforme referido acima. Em 5 dentre esses 8, o anti-HBs apareceu num tempo mínimo de 2 a um máximo de 20 semanas, com média de 10. Nos outros 3, o intervalo entre as colheitas das amostras foi muito longo o que impossibilitou a determinação do momento em que se deu a conversão.

Treze pacientes, nos quais o anti-HBs não foi detectado, foram observados durante um período que variou de 5 a 52 semanas, em média 14 semanas. Excluímos 2 casos de óbito e 4 sem tempo determinado.

Vinte e quatro pacientes dentre 35 estudados pela técnica de HAPR tiveram suas amostras de soro positivas para AgHBs (68,5%) enquanto pelo RIE, 31 deles eram positivos (88,5%).

Nos mesmos 35 primeiros pacientes foi pesquisado o anti-HBs pelo HAP, sendo todos negativos incluindo aqueles nos quais o anticorpo foi detectado pelo RIE.

ANTI-HBc

O anti-HBc esteve sempre presente em todas os pacientes desde a primeira amostra. Deste modo, a primeira amostra positiva correspondia ao momento em que estes pacientes chegavam à consulta. Nesta ocasião, já passavam 4 dias a 17 semanas de doença, em média 3 e meia semanas. A permanência do anti-HBc no soro dos pacientes na nossa amostragem coincidiu com o período de observação, o qual variou de 3 a 41 semanas, e em média 15 semanas, excluindo os casos de HCA (casos 120, 130) em que tal anticorpo ainda estava presente 2 anos depois da primeira manifestação clínica da doença.

SISTEMA e

Quatro pacientes (casos 95, 105, 120, 130) desenvolveram AgHBe. No primeiro deles, o antígeno foi detectado na 15ª semana depois dos primeiros sintomas, ocasião em que foi colhida a primeira amostra de soro, tendo negativado na 17ª semana da doença. Este paciente procurou-nos porque sua esposa estava grávida e com quadro clínico de hepatite por vírus. Contou-nos, então, que ele mesmo apresentara um distúrbio gastro-intestinal que durou apenas algumas horas, quatro meses antes. Naquela ocasião, as transaminases de seu soro foram dosadas e apresentaram ligeira alteração em seus níveis. Nada mais foi investigado. A pesquisa sorológica atual demonstrou a presença do AgHBs em ambos os parceiros.

No segundo paciente (caso 105) o AgHBs foi detectado apenas na primeira amostra de soro que foi colhida com 19 dias de evolução. Negativou na semana seguinte. No 3º e 4º pacientes o AgHBe foi pesquisado depois de dois anos de doença e nesta ocasião ele ainda estava presente.

Três pacientes apresentaram anti-HBe durante o período de observação. Em um deles (caso 57) o AgHBs já era negativo na primeira amostra; o outro (caso 32) também tinha negativado o AgHBs quando surgiu o anti-HBe. Finalmente no terceiro (caso 51) a presença transitória do anti-HBe se deu em presença do AgHBs.

PATOLOGIA EM RELAÇÃO AOS ASPECTOS CLÍNICO-EVOLUTIVOS

Neste grupo B, 6 pacientes foram submetidos a punção biópsia hepática. Uma delas (caso 13) por apresentar queixas hepatobiliares de longa data e porque a investigação para presença de cálculos biliares foram negativos. Esta incluía ultrassonografia e colangiografia. O exame histo

patológico mostrou apenas um quadro de hepatite aguda viral.

O segundo paciente (caso 50) exibia, além do quadro clínico compatível com HV, lesões máculo-papulares palmo-plantares de tipo sífilítica e reação sorológica positiva para lues. A histopatologia foi conclusiva de hepatite viral em fase de regressão. Embora a sorologia fosse positiva, a coloração pela prata foi negativa para *Treponema pallidum*.

O terceiro paciente (caso 12) desenvolveu um quadro de hepatite aguda grave com manifestações neurológicas exibindo um estado inicial de desorientação, articulação de palavras desconexas, coma vígil, com sinal de Babinski presente bilateralmente. A biópsia hepática, realizada 25 dias após este quadro clínico, revelou um quadro de hepatite aguda em fase de regressão. A reticulina e o tricrômico de Gomori não revelaram nenhuma alteração além da compatível com este diagnóstico.

O quarto paciente (caso 95) teve indicação de biópsia hepática por persistência do AgHBs e AgHBe além do tempo previsto, os quais foram detectados quando sua esposa desenvolveu um quadro clínico de hepatite por vírus. Sua biópsia, realizada 9 meses depois de uma manifestação gastro-intestinal que se acompanhou de discreta alteração nos níveis de transaminases, exibia um quadro histopatológico de hepatite crônica de difícil caracterização entre hepatite crônica persistente e agressiva. Ele se encontra em observação enquanto aguarda avaliação da progressão ou não da lesão hepática através de uma segunda biópsia.

A coloração pela orceína de Shikata realizada nestes quatro pacientes, foi negativa para o AgHBs em todos.

Dois outros pacientes (casos 120 e 130) foram submetidos à biópsia hepática por suspeita de serem portadores de hepatite crônica. No segundo deles (caso 130), a histopa

tologia hepática realizada um ano e meio depois dos sintomas iniciais revelou intenso infiltrado linfoplasmocitário que modificava a estrutura dos espaços-porta, invadindo a região perilobular. Deste modo, comprometia a placa limitante e os espaços-porta circunvizinhos dando formação a áreas "em"piecemeal-necrosis" (Fig.4 e 5). Septos ocasionais passivos uniam espaços-porta, que as colorações pela reticulina e tricrômico de Gomori demonstraram serem constituídos principalmente por fibras reticulínicas colapsadas (Fig.6). A coloração pela orceína de Shikata revelou presença de AgHBs com positividade fraca em algumas células.

No primeiro caso, foram realizadas 5 biópsias hepáticas durante um período de 5 anos. A primeira delas realizada no primeiro ano de observação revelou um quadro compatível com hepatite crônica com necrose "tipo bridging": septos conjuntivos, às vezes finos, outras vezes largos, acompanhados de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e neutrofílico. Tais septos, frequentemente sequestravam pequenos grupos de hepatócitos periportais formando pseudorosetas (Fig.7 e 8). Frequentemente observava-se hepatócitos com aspecto de vidro despolido (Fig.9 e 10). Na terceira biópsia já se viam numerosos septos conjuntivos que a partir dos espaços-porta dissecavam o lóbulo hepático constituindo micronódulos de tamanhos diferentes. Desta forma, a cirrose micronodular tornou-se claramente constituída. A análise da terceira biópsia pela ME revelou, no citoplasma dos hepatócitos, numerosas estruturas filamentosas ou arredondadas no interior das cisternas do retículo endoplasmático liso com as características do AgHBs (Fig.11 e 12). Observou-se também ao nível do núcleo, inúmeras partículas arredondadas (Fig.13). À microscopia ótica, utilizando a coloração pela orceína de Shikata, na terceira e quinta biópsia, o AgHBs pode ser demonstrado com facilidade (Fig.14).

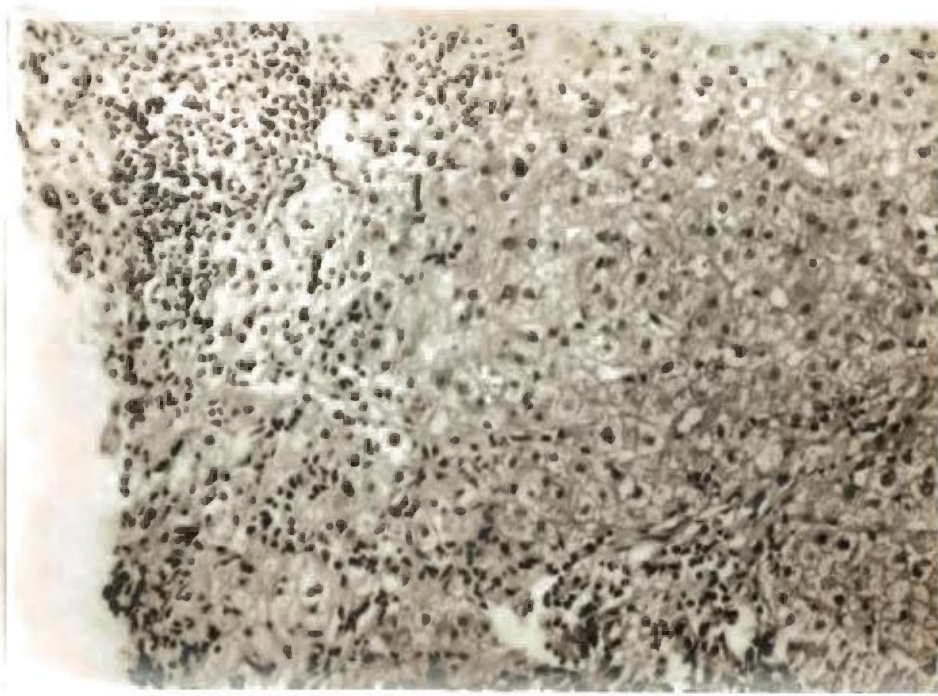


Fig.4 (caso 130) - Espaço-porta com intenso infiltrado linfoplasmacitário e destruição da placa limitante com infiltração inflamatória intralobular (HE-180x)

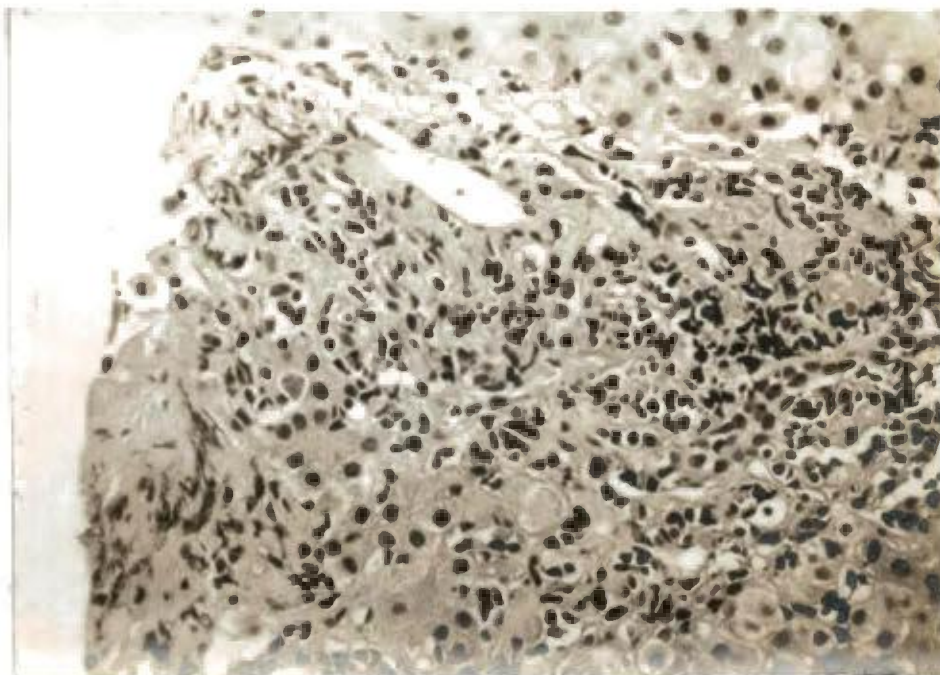


Fig.5 (caso 130) - Detalhe do espaço-porta mostrando a invasão do lóbulo pelo infiltrado inflamatório, observando-se ainda formação de corpúsculo de Councilman (HE-180x)

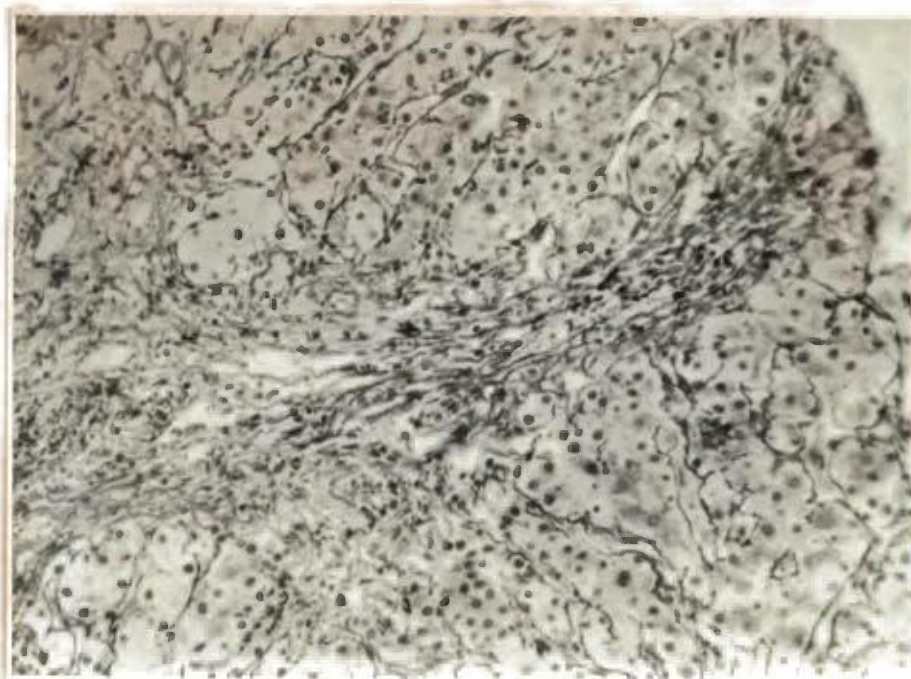


Fig.6 (caso 130) - Formação de septos intralobular por colapso das fibras de reticulina (Reticulina de Gomori - 180x)

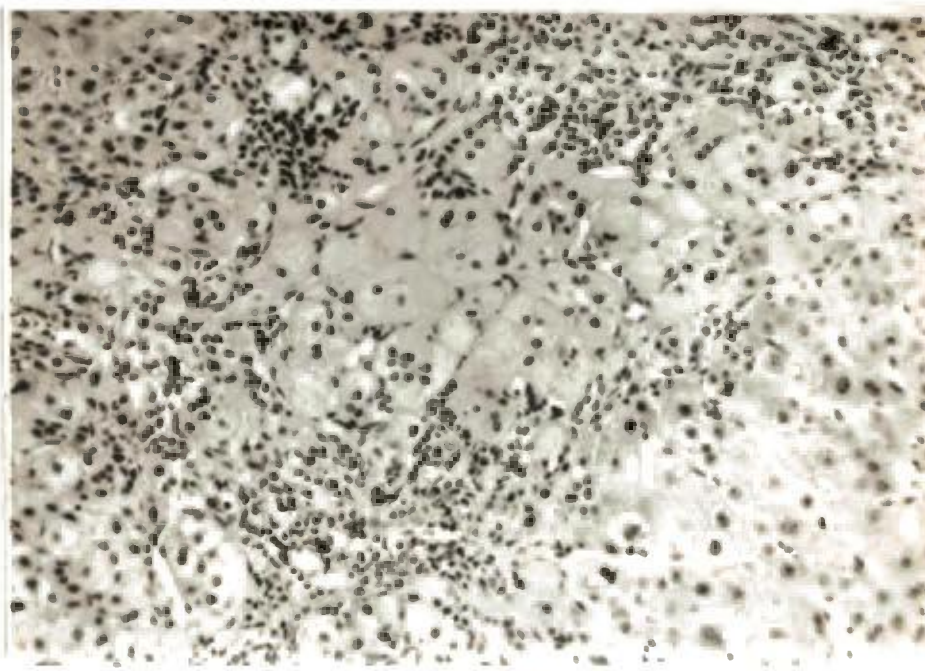


Fig.7 (caso 120) - Infiltrado lobular de natureza linfoplasmocitária invadindo áreas extensas de tecido hepático (HE-180x)

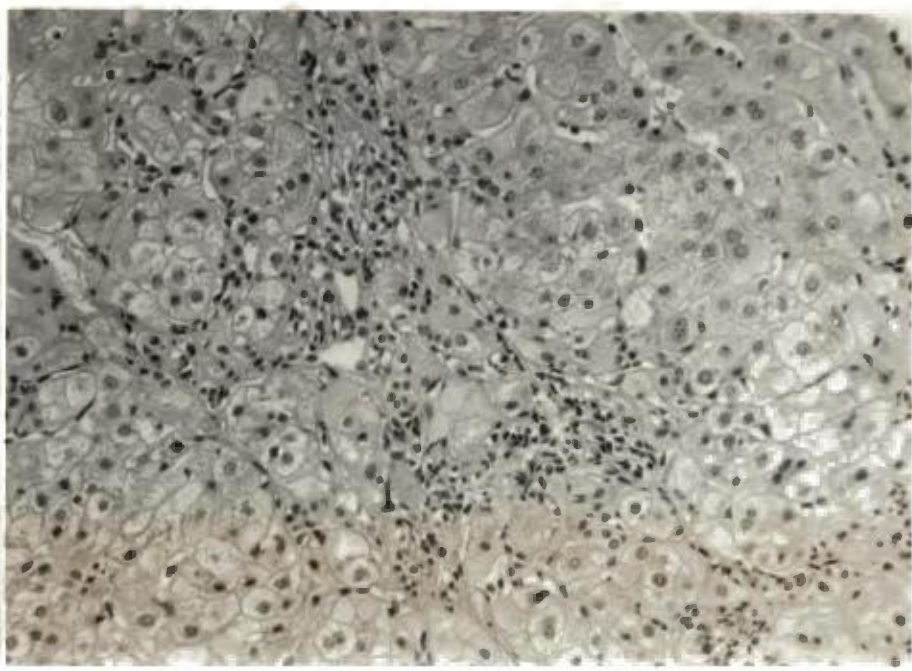


Fig. 8 (caso 120) - Células inflamatórias sequestrando grupos de hepatócitos com formação de pseudorosetas (HE-180x)

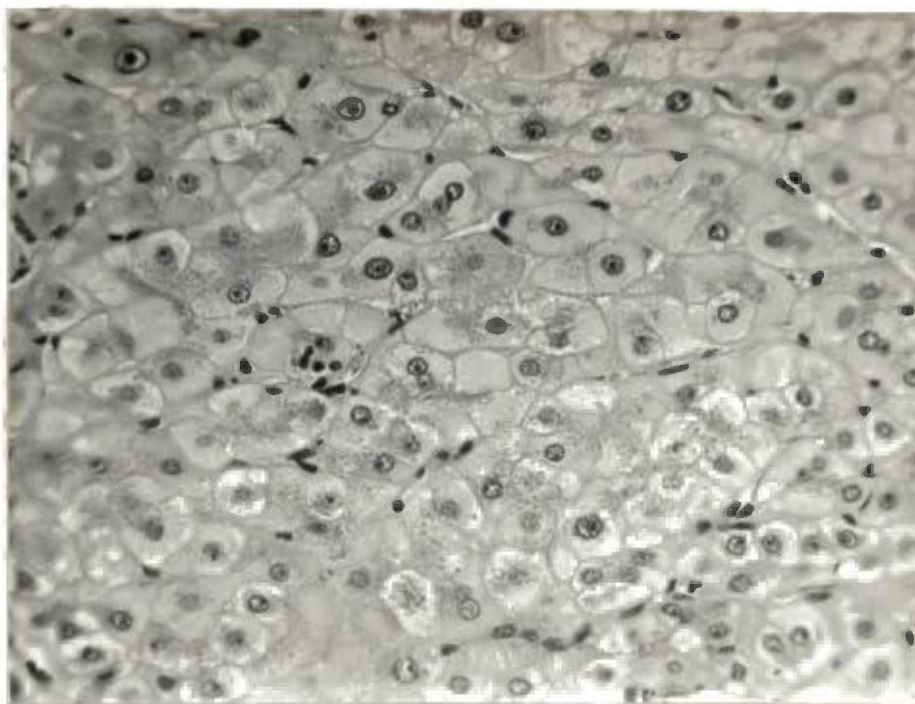


Fig.9 (caso 120) - Inúmeros hepatócitos de citoplasma hialinizado com aspecto em "vidro despolido" (HE-360x)

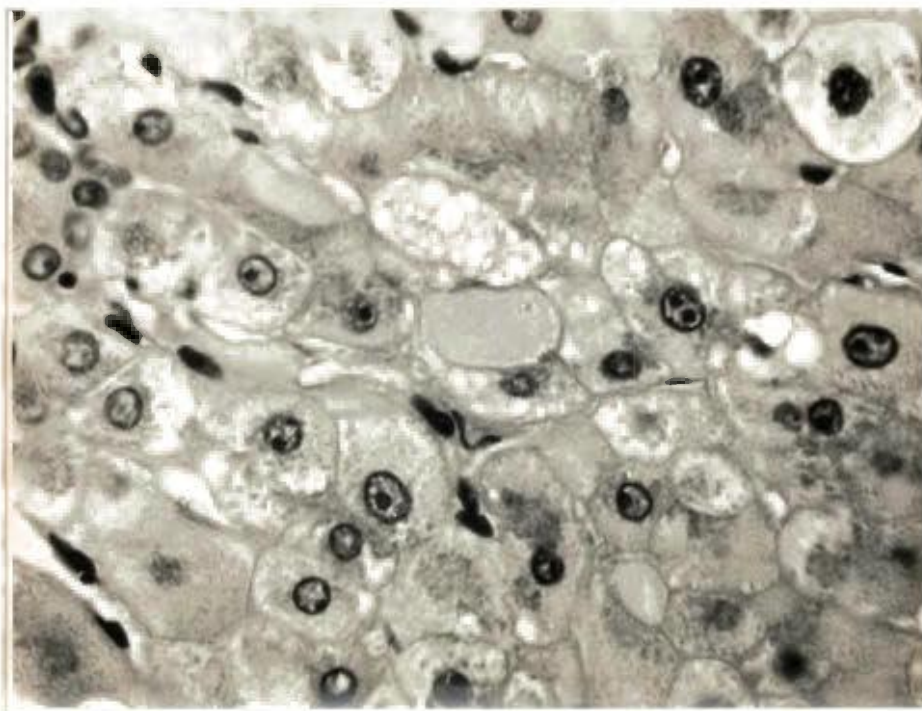


Fig.10 (caso 120) - Detalhe dos hepatócitos mostrando citoplasma hialinizado e ausência de núcleos, ao lado de outros com aspecto em "vidro despolido" (HE-720x)

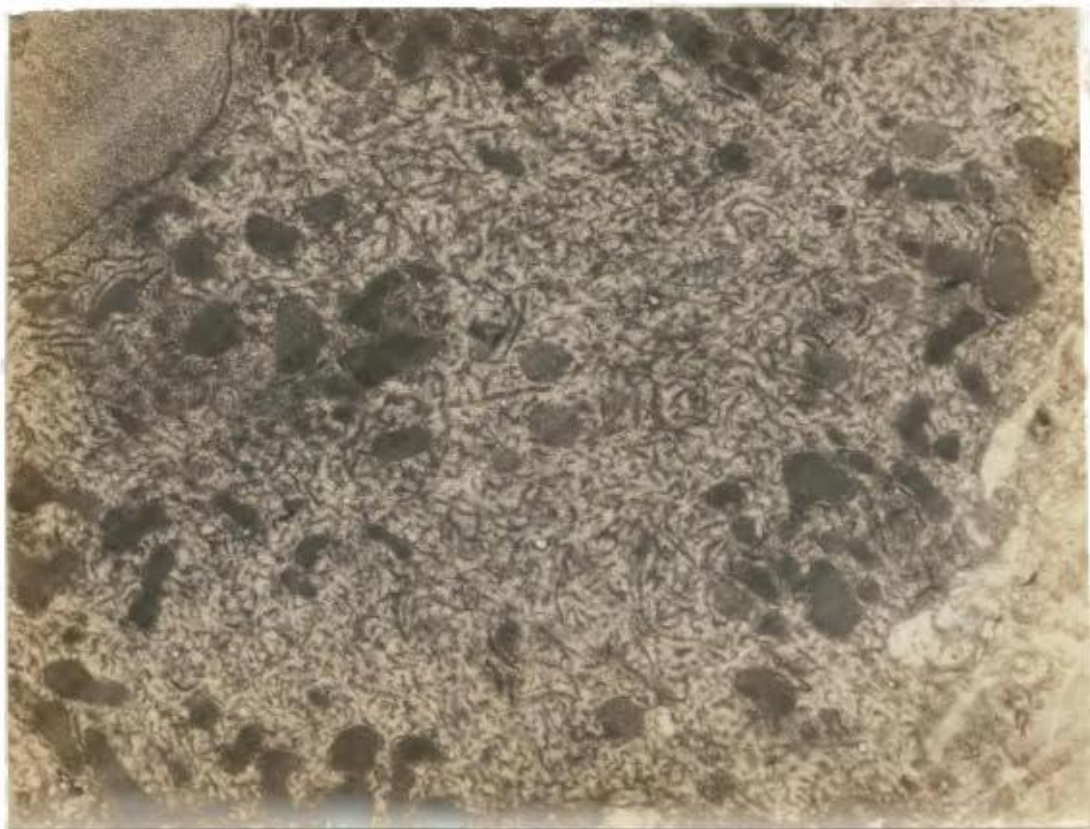


Fig.11 (caso 120) - Micrografia eletrônica de uma porção do hepatócito mostrando retículo endoplasmático liso proliferado, contendo partículas filamentosas, deslocando outras estruturas citoplasmáticas notadamente mitocôndrias (ME-11 900x)



Fig.12 (caso 120) - Detalhe do caso anterior evidenciando dilatação das cisternas do retículo endoplasmático que mostram em seu interior estruturas arredondadas e filamentares (ME-34.000x)



Fig. 13 (caso 120) - Detalhe do núcleo do hepatócito evidenciando numerosas partículas arredondadas agrupadas em meio a grumos de cromatina (ME-51 000x)

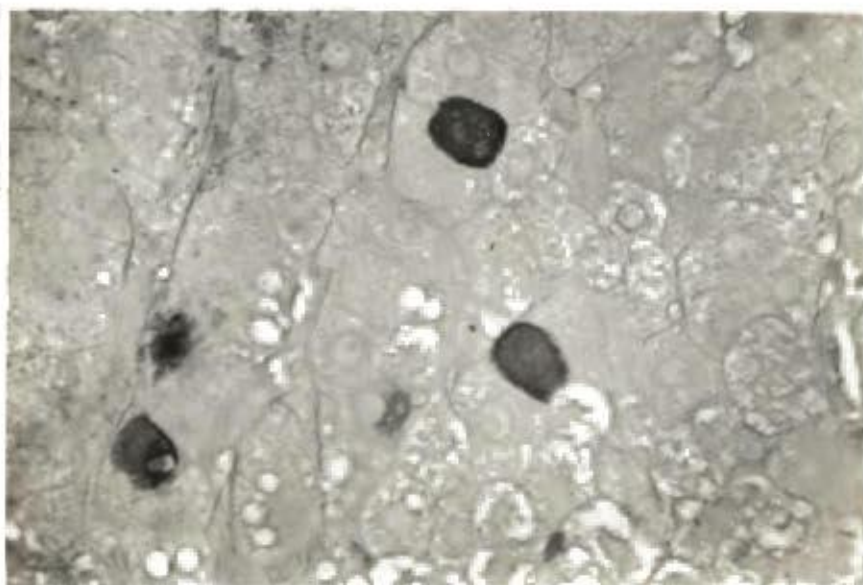


Fig.14 (caso 120) - Aspecto dos hepatócitos con
tendo AgHBs (Orceina de Shikata - 720x)

A necrópsia dos casos de hepatite fulminante mostrou, no primeiro deles (caso 1), um fígado de consistência firme, pesando 1020 g, de superfície lisa, de cor castanha escura, com áreas vinhosas e pontos esparsos amarelados. A histopatologia revelou áreas extensas de necrose de hepatócitos predominantemente centro e mediozonais, onde os sinusóides mostram-se acentuadamente dilatados, contendo hemácias em forma de foice. Os espaços-porta, com delimitação pouco precisa apresentavam na periferia neoformação ductal e discreto infiltrado mononuclear. O segundo (caso 28) tinha um fígado de consistência bastante diminuída, superfície rugosa, coloração acastanhada, pesando 420 g, e cápsula enrugada. A microscopia ótica mostrava uma estrutura lobular e trabecular alteradas por extensas áreas de necrose. Os hepatócitos preservados eram volumosos contendo pequenos vacúolos e pigmento biliar. Observavam-se focos de regeneração canalicular e áreas de discreto infiltrado mononuclear nos espaços-porta. A coloração pela orceína de Shikata foi negativa nos 2 casos.

AgHBs NA SALIVA

O AgHBs foi pesquisado pelo RIE na saliva de 35 pacientes, independentemente de antígenemia e os resultados foram os seguintes: em 10 pacientes o antígeno foi encontrado no soro e na saliva; em dois o antígeno estava presente no soro, mas não na saliva e nos 23 pacientes restantes estava ausente em ambos.

Todas estas amostras foram testadas pela HAPR, mas foram todas negativas. Finalmente testamos por um terceiro método, o ELISA, apenas com as amostras que foram positivas pelo RIE. Também por este último não conseguimos demonstrar o AgHBs.

GRUPO C

Em 10 pacientes, a pesquisa de todos os marcadores da HB foi negativa, da mesma forma que a IgM específica para HA. Um outro paciente (caso 81) tinha anti-HBc e anti-HBs na ausência de AgHBs, no terceiro dia de doença, razão pela qual não valorizamos os achados dos elementos antigênicos. Nós os agrupamos sob a designação de grupo C, totalizando assim 11 pacientes.

O paciente mais jovem (caso 46) tinha 13 anos, era o único com idade abaixo de 20. Cinco deles tinham mais de 40 anos e 5 estavam entre 20 e 32 anos de idade.

Em três deles (casos 42, 90 e 46) a IgM específica foi pesquisada pela primeira vez no 36º, 50º e 51º dia de doença. Nos outros, o fora num tempo menor que 15 dias a contar dos primeiros sintomas.

A cura clínica e laboratorial se deu, em 1 paciente, em menos de um mês; dois não chegaram a 2 meses e em dois a cura se deu pouco mais que 2 e 5 meses respectivamente. Seis ainda apresentavam alterações das transaminases e das bilurrubinas na última consulta a qual compareceram, respectivamente no 10º, 21º, 42º, 52º, 114º e no 160º dia de evolução.

Na investigação clínica, a possibilidade de qual quer evento epidemiológico era completamente descartada em quatro pacientes. Um paciente (caso 42) fez uso de injeções um ano antes; um outro (caso 53) relatou ter tido quadro clínico semelhante dois anos antes, época em que foi submetido à biópsia hepática. Um paciente (caso 109) tinha história de tratamento de tuberculose pulmonar 6 meses antes. No momento, não estava em uso de qualquer droga, mas apresentava escarros hemoptóicos. Duas pacientes (casos 8 e 81) receberam transfusão sanguínea. A primeira por sangramento de úlceras duodenal 40 dias antes e a outra durante uma cesaria

na 2 meses antes (caso 81). Um outro (caso 44) fez uso de antibiótico para tratamento de infecção urinária 3 dias antes do início de sua doença atual. Finalmente um paciente (caso 46) contou que havia 5 casos de hepatite na sua vizinhança. Nos outros 3 pacientes (casos 14, 60, 90) faltava qualquer elemento epidemiológico conhecido.

PATOLOGIA EM RELAÇÃO AOS ASPECTOS CLÍNICO-EVOLUTIVOS

Dois pacientes deste grupo foram biopsiados. Um deles (caso 53) porque havia apresentado um quadro clínico semelhante ao atual, dois anos antes. A histopatologia revelou apenas um quadro de hepatite aguda em fase de resolução.

Um outro paciente (caso 46) tinha 13 anos de idade e apresentava uma recuperação clínica lenta e uma flutuação discreta nos níveis de transaminases e de bilirrubinas durante a fase correspondente à convalescência. A biópsia hepática foi realizada no 113º dia de evolução da doença. A histopatologia revelou faixas de necrose de hepatócitos com colapso da trama de reticulina as quais formavam pontes entre os espaços-porta ou, mais raramente, entre espaços-porta e veias centro-lobulares (Fig. 15). A reticulina de Gomori mostrou colapso da trama e aparecimento de fibras colâneas, estas melhor evidenciadas pelo tricrômico de Gomori. Neste caso, o diagnóstico foi de hepatite viral aguda com necrose tipo "bridging".

A coloração pela orceína de Shikata, nos dois casos, foi negativa para o AgHBs.

Uma preocupação nossa é de excluir o VICM e o VEB deste grupo, o que não pudemos até o momento, realizar.

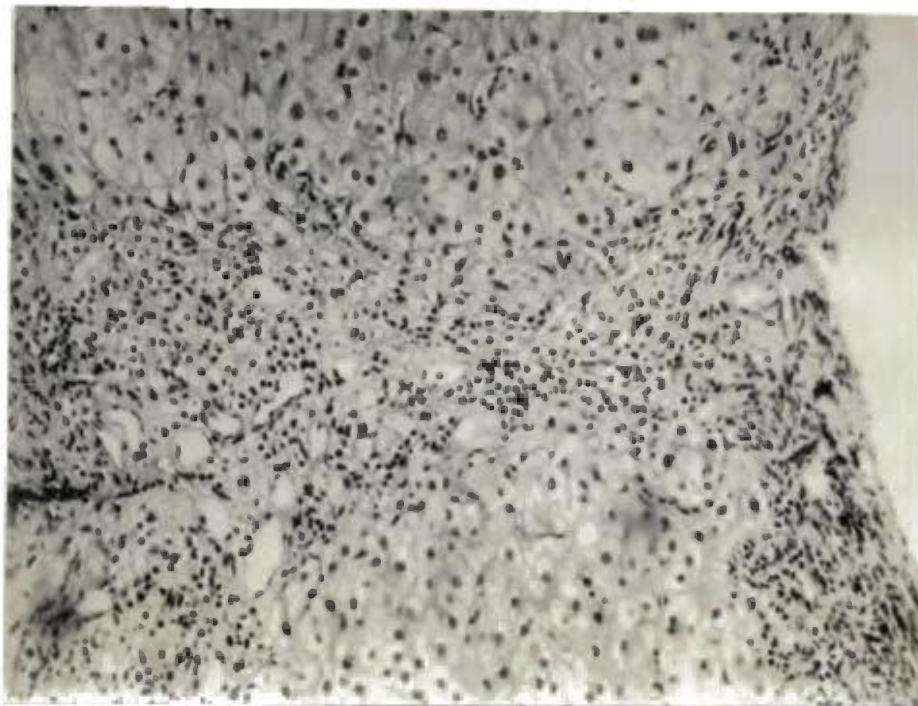


Fig. 15 (caso 46) - Hepatite aguda. Área de necrose em ponte observando-se desaparecimento de hepatócitos e infiltrado inflamatório mono e polimorfonuclear (HE-180x)

GRUPO D

Este grupo inclui 8 pacientes cujo diagnóstico etiológico não caberia, sem questionamento e de uma maneira definitiva, dentro de qualquer dos grupos anteriores mesmo como infecção mista.

Os resultados da pesquisa sorológica dos marcadores desse grupo de pacientes foram reunidos na tabela VI para permitir uma visão conjunta do que descreveremos.

Em 5 deles, a IgM específica para HA foi positiva simultaneamente com algum dos marcadores da HB. Em um desses (caso 101) o único desses marcadores detectado pelo RIE foi o AgHBs. Em um outro paciente (caso 56) havia associação da IgM com anti-HBc e anti-HBs na primeira amostra, mas a segunda amostra com um intervalo de 7 dias, estando o paciente na segunda semana de doença, foi negativa para ambos os marcadores. Um outro dado era a IgM ter sido negativa na primeira amostra, no 10º dia da doença e positiva 7 dias depois. Quanto aos outros três pacientes (casos 96, 93 e 86), mesmo aplicando o teste confirmatório da reatividade do AgHBs ou mesmo empregando outro método, o ELISA, não se pode concluir a respeito deste marcador.

Nos três pacientes restantes, a IgM específica para HA foi negativa sendo que em um deles (caso 65) a primeira pesquisa na primeira amostra foi positiva, mas este resultado não se confirmou quando a amostra foi retestada. Em dois deles (caso 66 e 91) mesmo após o teste confirmatório para o AgHBs e ELISA, os resultados foram inconclusivos. No primeiro deles (caso 66) a IgM foi pesquisada 90 dias após os primeiros sintomas.

TABELA VI - PERFIL SOROLÓGICO DOS PACIENTES DO GRUPO D

NOME (Nº PAC.)	Nº AMOSTRA	AUSRIA	CONFIR- MATÓRIO	ELISA	ANTI-HBe	CORAB	AUSAB	IgM
MCC(101)	787			-		-	-	+
	788	+		-		-	-	
	792	+	-	+		-	-	
	798	+		-		-	-	
	870	+		-		-	-	
	876	+	+	-		-	-	
PS(56)	516	-				+	+	-
	518	-				-	-	+
	520	-						+
JGS(96)	710	+	-	-		+	-	+
	716	+	+	-		+	-	+
JAF(93)	767	+	-	-		+	-	+
	770	+		-		+	-	+
	775	+		+		-	-	
	871	+	+	-		-	-	
MLA(86)	642	-				+	-	+
	682	+	+	-		+	+	
	703	+		+limite		-	-	
FGS(66)	559	-				-	+	- (*)
	560	-				-	+	
	563	+		+		+	+	
	564	-				-		
	555	-				-		-
	577	-				-		
	591	-				-		
	580	-				-		
	593	+	+	-		+		-
	600	+		-		-	+	
	609	+		-		-	+	
ZMA(91)	754	+		-		+		- (**)
	704	+	-			+	-	
	760	-				-	-	
	732		+	-		+	-	
FR(65)	532	-			+	-	-	+ - + inconclusivo -
	533	-			-	+	+	
	534	-			-	+	+	
	558	-			-	+	+	
	569	-			-	+	+	
	566	-			-	+	+	
	568	-			+	+	+	
	585	-				+	+	
	601	-		+	-	+	+	
	594	-			-	+	+	
	598	+		-	+	+	+	
	604	+	+	+	-	+	+	
	631	-	+		-	+	+	

(*) 90º dia doença

(**) 7º dia doença

PATOLOGIA EM RELAÇÃO AOS ASPECTOS CLÍNICO-EVOLUTIVOS

Um paciente deste grupo (caso 65) foi submetido à biópsia hepática duas vezes. Ele tinha 4 anos de idade e apresentava um quadro clínico recorrente, de evolução arratada a qual culminou com desenvolvimento de ascite. A primeira biópsia (Fig.16) era pouco expressiva em relação ao quadro clínico, sendo realizada uma segunda, nove meses de pois, a qual revelou um comprometimento maior dos espaços-porta (Fig.17). A reticulina de Gomori mostrou colapso de fibras, com formação de pseudonódulos (Fig.18) e seqüestração de grupos de hepatócitos periportais (Fig.19). Este paciente está sendo acompanhado ambulatorialmente e, no momento, ele mantém as transaminases e bilirrubinas dentro dos limites normais, embora com níveis de atividade de protrombina baixos (35 mg%). O fragmento de tecido hepático foi negativo para AgHBs quando corado com a orceína de Shikata.

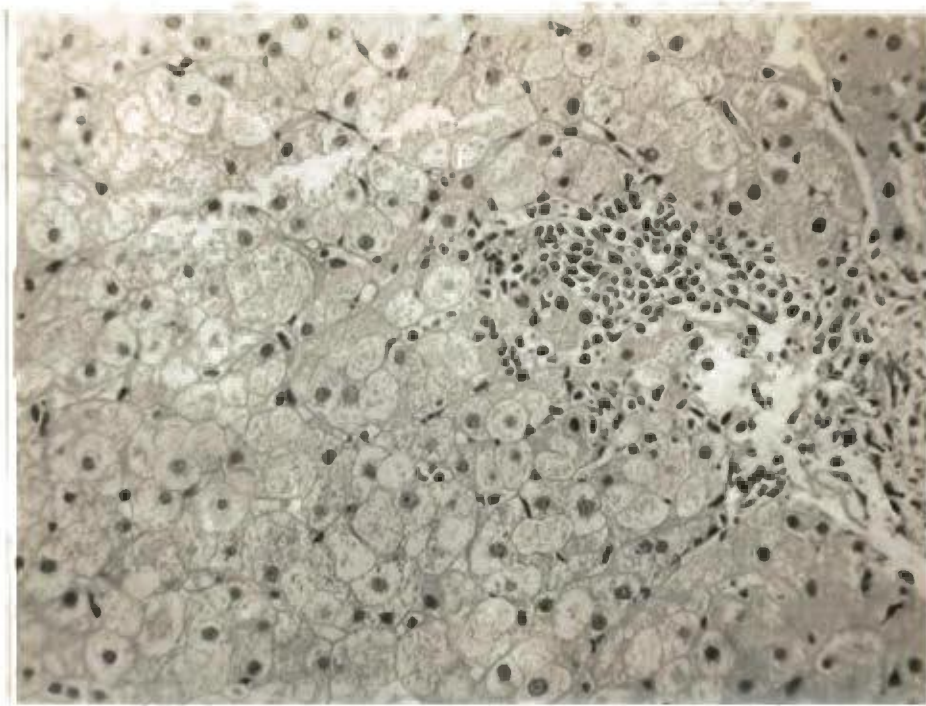


Fig.16 (caso 65) - Primeira biópsia. Aspecto da infiltração inflamatória mononuclear portal. Os hepatócitos mostram-se preservados, não existindo infiltração lobular (HE-360x)



Fig.17 (caso 65) - Segunda biópsia. Intenso infiltrado portal de natureza linfoplasmocitária ao lado de focos inflamatórios intra-lobular (ME-180x)

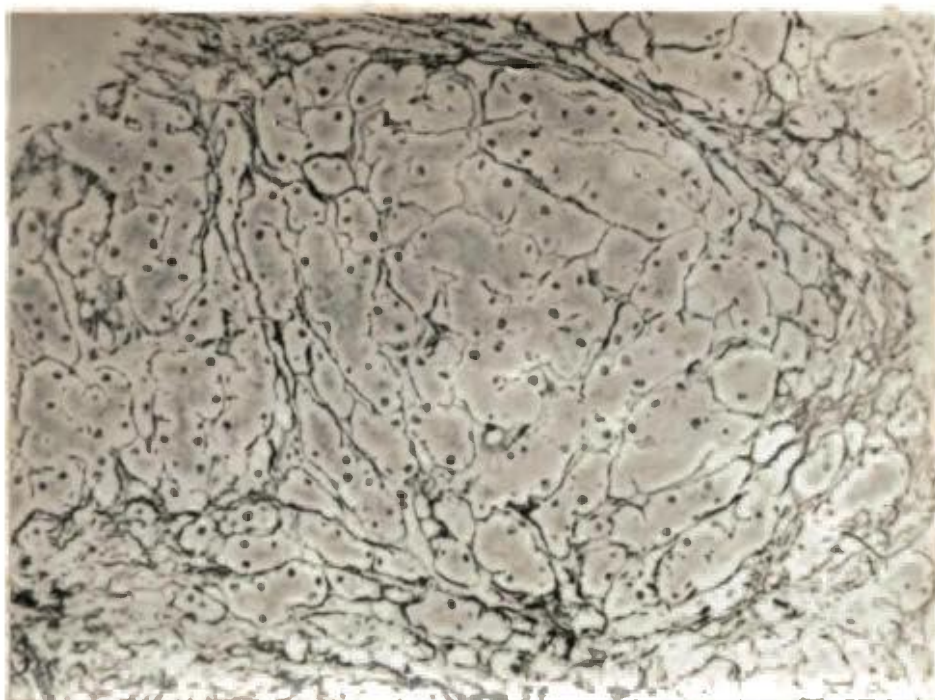


Fig.18 (caso 65) - Segunda biópsia. Colapso da trama de reticulina com esboço de formações nodulares (Reticulina de Gomori - 180x)

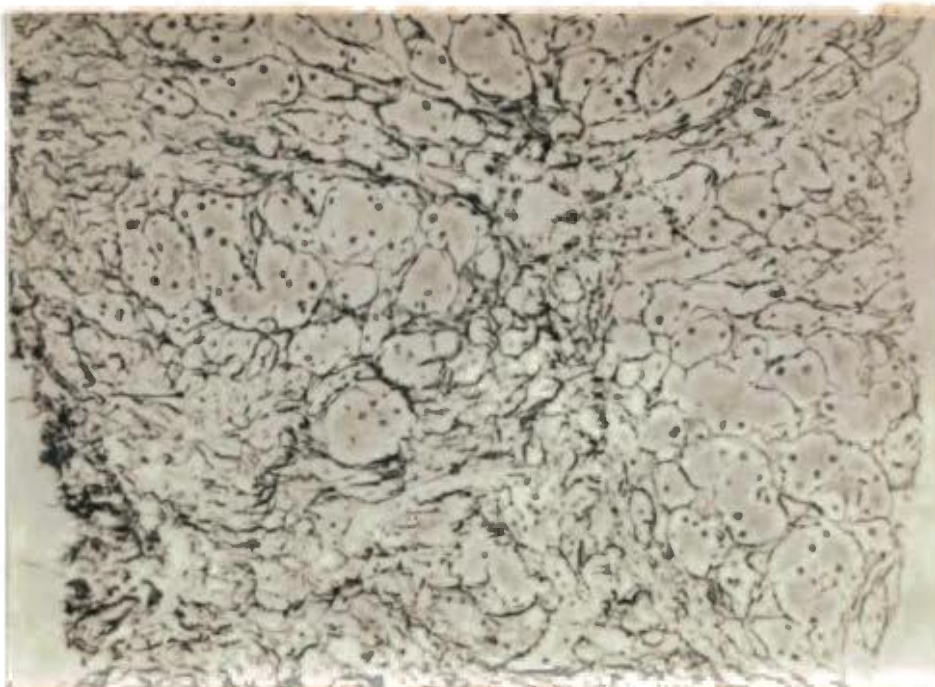


Fig.19 (caso 65) - Segunda biópsia. Espaço-porta com aumento de fibras reticulínicas que se acham colapsadas na região peri-portal sequestrando grupos de hepatócitos (Reticulina de Gomori - 180x)

ANÁLISE CLÍNICA E BIOQUÍMICA SIMULTÂNEA DOS GRUPOS

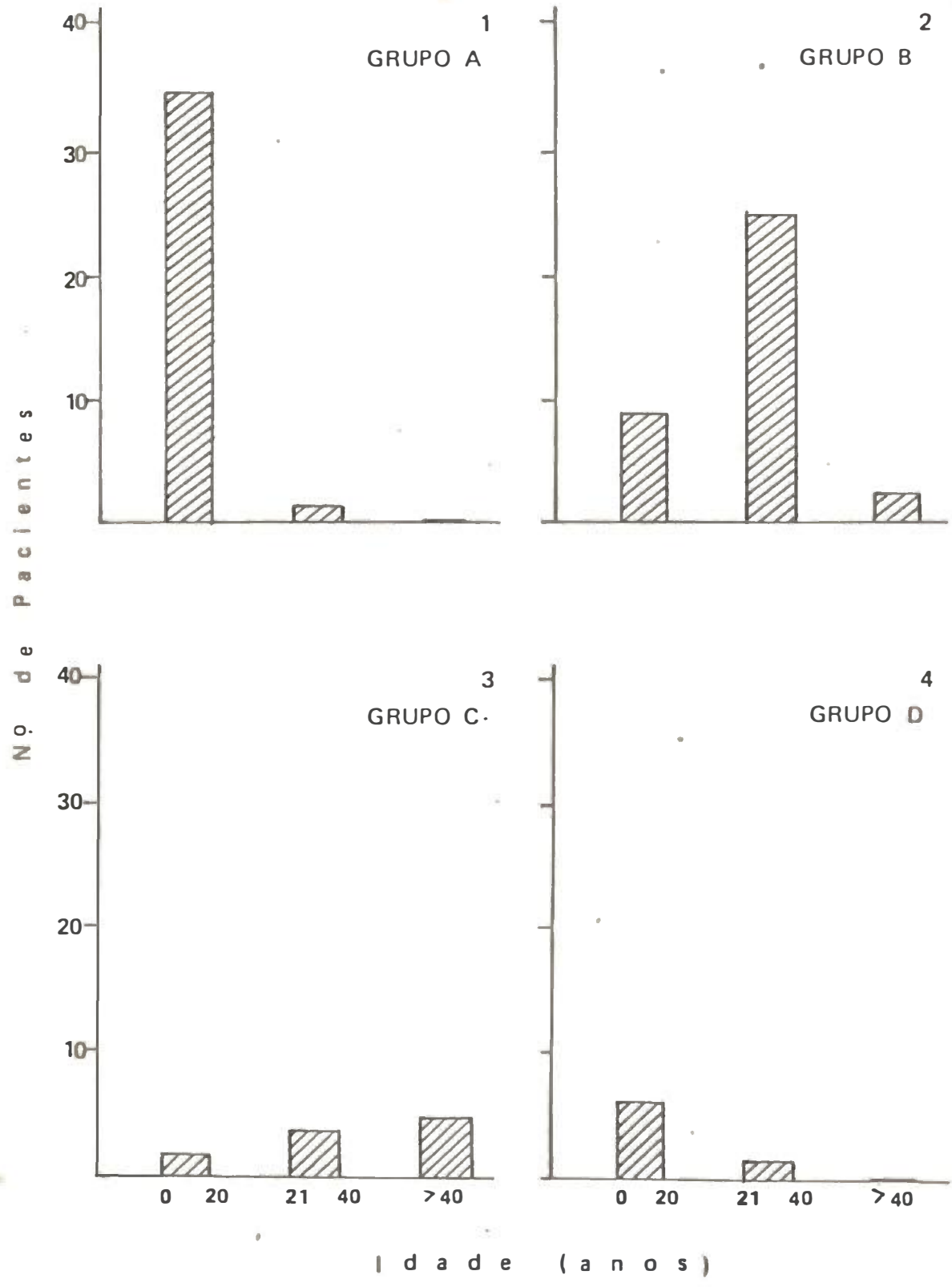
FAIXA ETÁRIA

Conforme se pode verificar na tabela VII e no gráfico 1, houve um acúmulo de crianças (menores de 10 anos de idade) e de jovens na faixa etária compreendida entre 11 e 20 anos no grupo A. Dois pacientes estavam na faixa de 21 a 30 anos; e de um, a idade não constava no registro. O grupo constava de 17 mulheres e 20 homens. No grupo B (gráfico 2) dos quais 25 eram do sexo feminino e 10 do masculino, oito pacientes eram menores de 20 anos; 17 estavam na faixa de 21 a 30 anos e 8 na de 31 a 40 anos; dois eram maiores de 50 anos de idade. No grupo C (gráfico 3) havia, com exceção da primeira década, onde não se enquadrava nenhum paciente, uma distribuição quase uniforme nas diferentes faixas etárias. No grupo D (gráfico 4) ao contrário, havia um acúmulo nas duas primeiras décadas.

TABELA VII - FAIXA ETÁRIA

FAIXA ETÁRIA	GRUPO A			GRUPO B			GRUPO C			GRUPO D			TOTAL
	M	F	total	M	F	total	M	F	total	M	F	total	
0 - 10	10	11	21	1	3	4	-	-	-	2	-	2	27
11 - 20	7	6	13	3	1	4	2	-	2	3	2	5	24
21 - 30	2	-	2	5	12	17	2	-	2	-	-	-	21
31 - 40	-	-	-	-	8	8	-	2	2	-	1	1	11
41 - 50	-	-	-	-	-	-	1	2	3	-	-	-	3
> 50	-	-	-	1	1	2	-	2	2	-	-	-	4
S/informação	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
TOTAL	20	17	37	10	25	35	5	6	11	5	3	8	91

FAIXAS ETÁRIAS RESPECTIVAMENTE NOS GRUPOS A, B, C e D



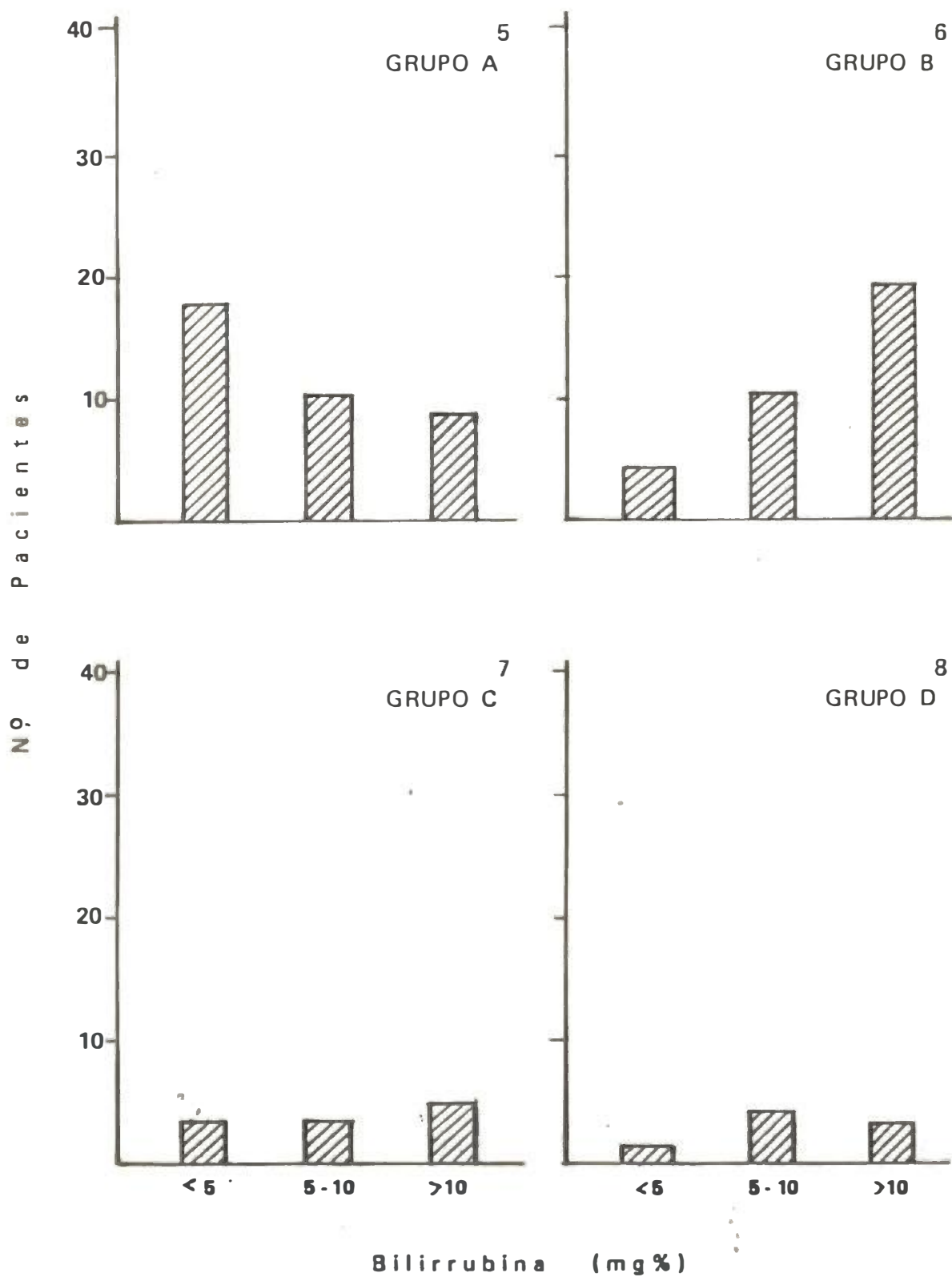
BILIRRUBINA

Pela tabela VIII e gráficos 5 e 6 pode-se observar que as oscilações, neste parâmetro, eram evidentes entre os grupos A e B. O grupo A tendia a ter níveis de bilirrubina predominantemente menores quando comparados com o grupo B, cuja tendência se inclinava para níveis mais elevados. No grupo A, quatro pacientes apresentavam níveis bastante elevados, superiores a 30 mg%. Em 3 deles (casos 26, 35, 20), a cura clínica se deu num intervalo de 41 a 46 dias, sem nenhuma particularidade na sua evolução. A idade desses pacientes era 11,8 e 9 anos. O quarto paciente (caso 2) era uma menina de 3 anos de idade que após a remissão do quadro clínico e laboratorial sofreu recorrência transitória, razão pela qual foi submetida à biópsia hepática. Os grupos C e D não mostravam tendências para nenhuma das duas direções (tabela VIII e gráficos 7 e 8).

TABELA VIII - BILIRRUBINA - NÍVEIS MÁXIMOS

BILIRRUBINA mg%	GRUPO A		GRUPO B		GRUPO C		GRUPO D	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
< 5	18	48,65	4	11,43	3	27,27	1	12,5
5 - 10	10	27,03	10	28,58	3	27,27	4	50,0
11 - 20	3	8,10	14	40,0	2	18,18	2	25,0
21 - 30	1	2,70	4	11,43	1	9,10	1	12,5
> 30	4	10,82	1	2,85	2	18,18	-	-
não realizado	1	2,70	2	5,71	-	-	-	-
TOTAL	37	100	35	100	11	100	8	100

BILIRRUBINA EM mg% - VALORES MÁXIMOS NOS GRUPOS A, B, C e D



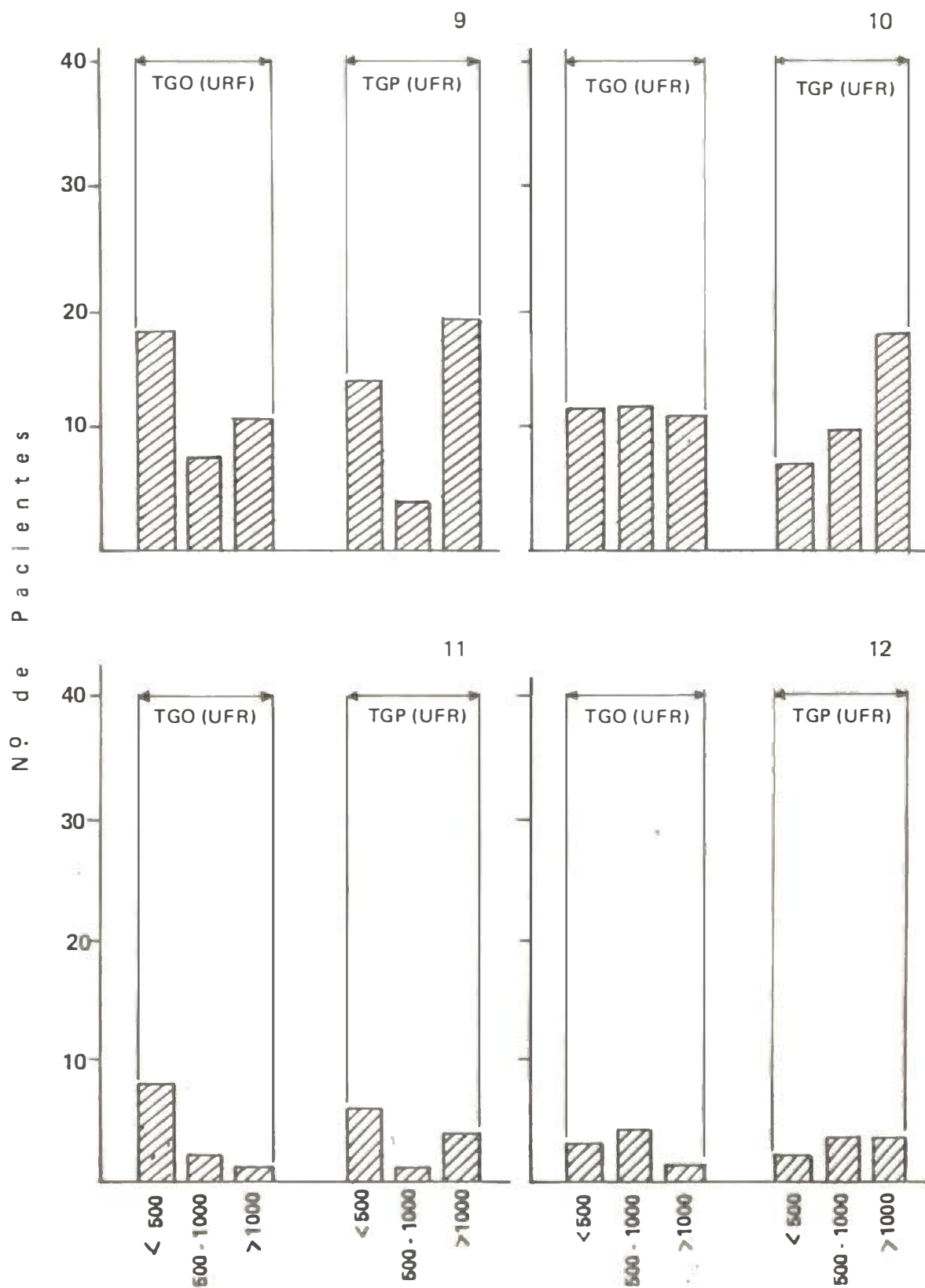
TRANSAMINASES

Os valores das transaminases menores que 100 U FR foram encontrados em pacientes do grupo B com doença hepática crônica e nos pacientes do grupo A que procuraram o ambulatório já em fase mais tardia da doença. Nesses pacientes ainda que a transaminase glutâmica oxalacética estivesse em níveis inferiores a 100 U FR, a purúvica era superior a este limite. Não havia diferença significativa entre os valores destas enzimas quando se comparavam os diversos grupos (Tabela IX e gráficos 9, 10, 11 e 12).

TABELA IX - TRANSAMINASES - NÍVEIS MÁXIMOS

NÍVEIS DE TRANSAMI NASES U FR	TGO					TGP				
	Nº PACIENTES					Nº PACIENTES				
	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Total	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Total
< 100	5	1	-	-	6	-	2	1	1	4
100 - 500	13	11	8	3	35	14	5	5	1	25
500 - 1000	8	12	2	4	26	4	10	1	3	18
> 1000	11	11	1	1	24	19	18	4	3	44
TOTAL	37	35	11	8	91	37	35	11	8	91

TRANSAMINASES EM UFR – NÍVEIS MÁXIMOS NOS GRUPOS A, B, C e D



FOSFATASE ALCALINA

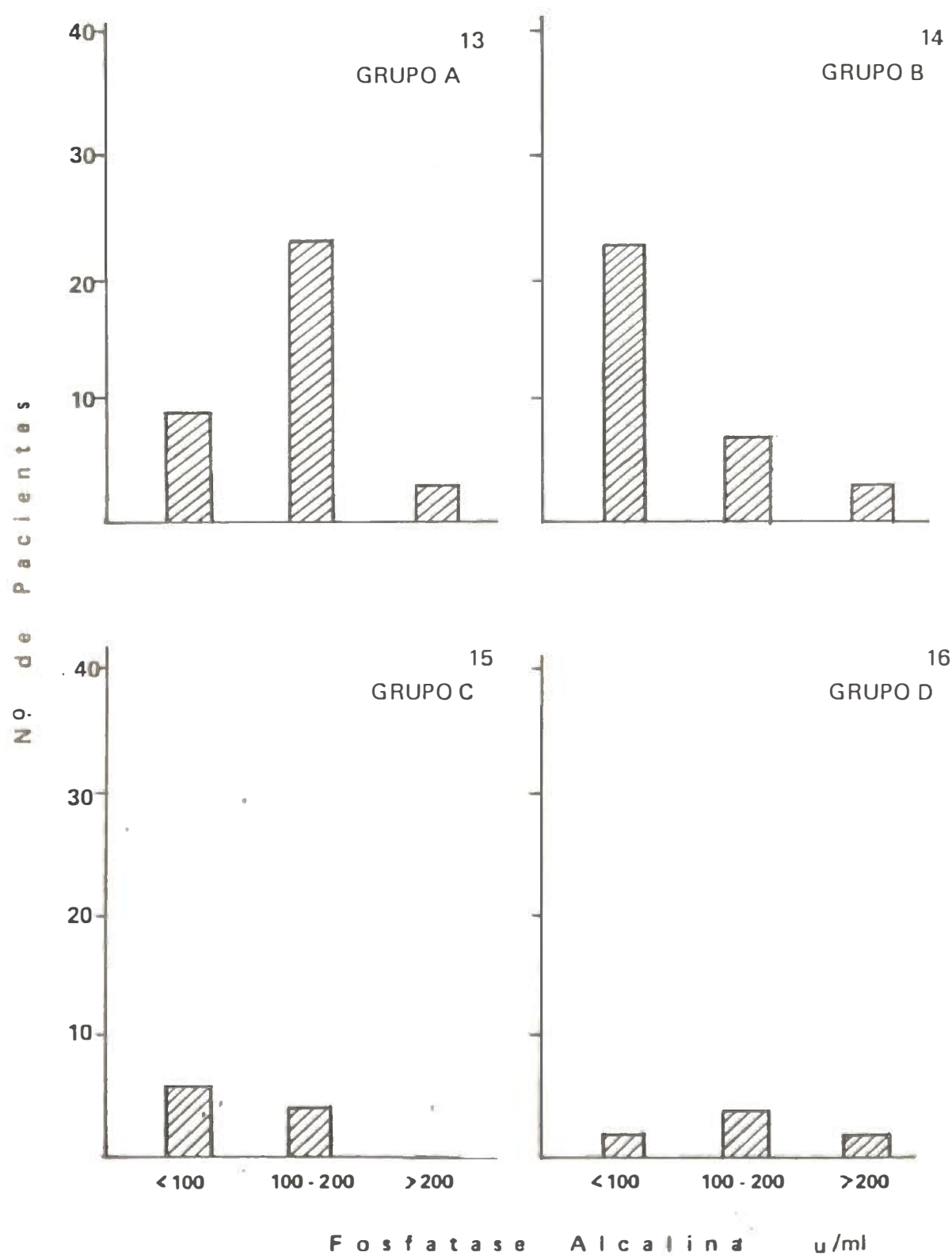
Neste parâmetro (Tabela X e gráficos 13 e 14) a tendência era oposta ao observado com a bilirrubina, isto é, o grupo B mais frequentemente tendia a exibir valores menores quando comparados ao grupo A. Os grupos C e D não mostravam tendências significativas em nenhuma direção (Tabela X e gráficos 15 e 16).

TABELA X - FOSFATASE ALCALINA - NÍVEIS MÁXIMOS

FOSFATASE ALCALINA u/ml*	GRUPO A		GRUPO B		GRUPO C		GRUPO D		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
< 70	4	10,8	14	40	2	18,1	2	25	22	24,2
70-100	5	13,5	9	25,8	4	36,4	-	-	18	19,8
> 100-200	23	62,2	7	20	4	36,4	4	50	38	41,8
> 200	3	8,1	3	8,5	-	-	2	25	8	8,8
não realiza da	2	5,4	2	5,7	1	9,1	-	-	5	5,4
TOTAL	37	100	35	100	11	100	8	100	91	100

(*) Valor normal = u/ml

FOSFATASE ALCALINA EM μ /ml – NÍVEIS MÁXIMOS NOS GRUPOS A, B, C e D



DURAÇÃO DA DOENÇA

Na tabela XI e nos gráficos 17, 18, 19 e 20 destacamos o tempo de duração da doença nos diferentes grupos. Neles podemos verificar que 22 pacientes (assinados com Alt. Lab.) deixaram de comparecer à consulta antes que as transaminases e/ou bilirrubinas retornassem a seus níveis normais.

Um paciente do grupo A evoluiu para o óbito dentro de 18 dias a partir dos primeiros sintomas, com hepatite fulminante (caso 52). Dos 3 pacientes do grupo B que evoluíram para o óbito, 2 o foram com 14 e 19 dias (casos 28 e 1) com hepatite fulminante e o terceiro (caso 120) que era uma paciente com hepatite crônica ativa e cirrose, o óbito se deu no quinto ano de observação.

Estão incluídos no item "sem informação" aqueles pacientes cujo intervalo entre a última amostra com enzimas e/ou bilirrubinas alteradas e a normal era por demais longo para dar uma idéia precisa; ou que o paciente não informava o exato início da doença ou mesmo por falha na anotação na ficha do paciente.

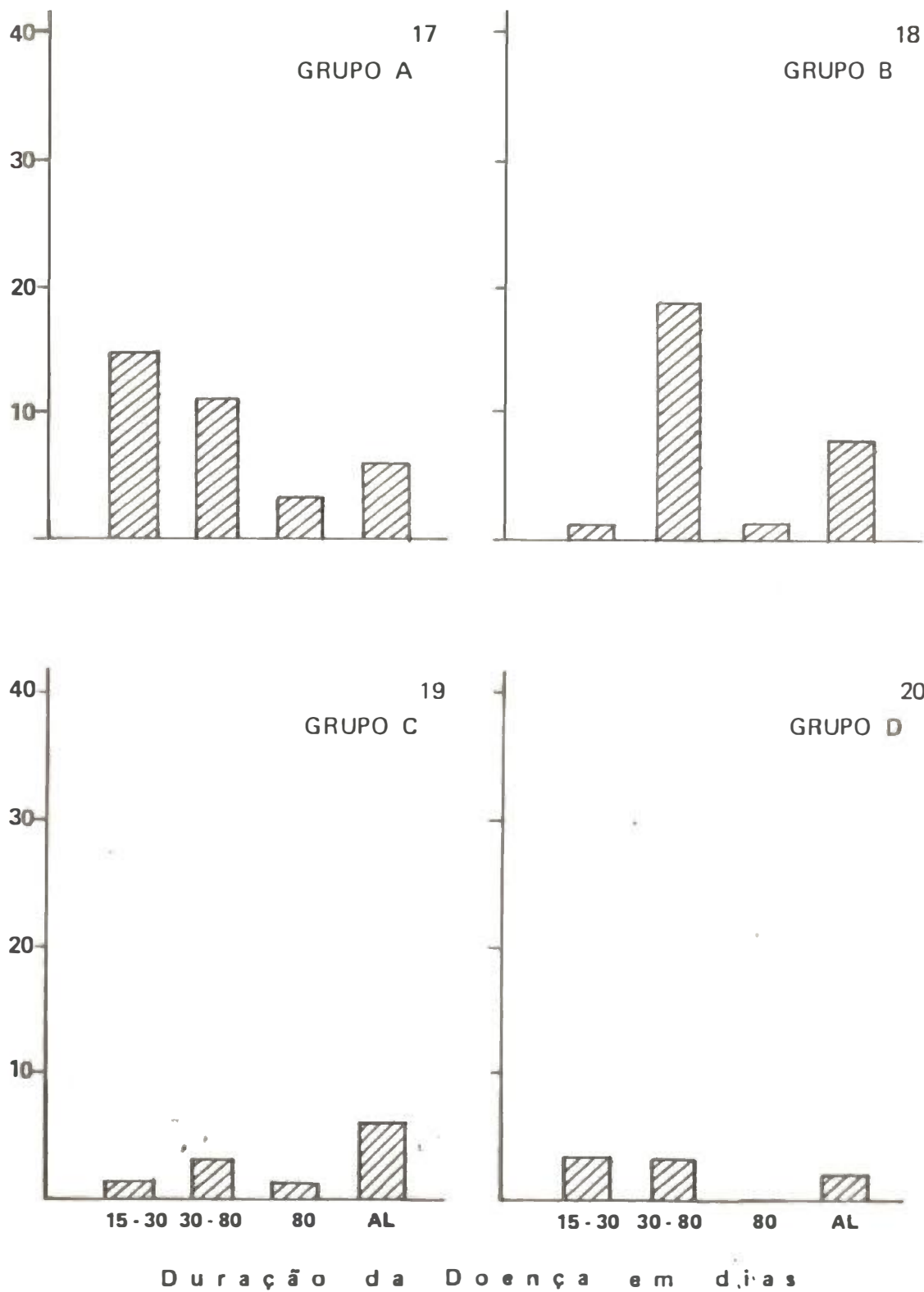
Os demais dados da tabela serão analisados no capítulo de discussão.

TABELA XI- DURAÇÃO DA DOENÇA

DURAÇÃO DA DOENÇA EM DIAS	GRUPO A		GRUPO B		GRUPO C		GRUPO D		TOTAL	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
15-30	15	40,5	1	2,9	1	9,1	3	37,5	20	21,9
31-60	7	18,9	15	42,9	2	18,1	2	25	26	28,6
61-80	4	10,8	4	11,5	1	9,1	1	12,5	10	10,9
81-120	2	5,4	1	2,9	-	-	-	-	3	3,3
121-180	1	2,7	-	-	1	9,1	-	-	2	2,3
c/Alt. Lab.*	6	16,3	8	22,8	6	54,6	2	25	22	24,2
óbito	1	2,7	3	8,5	-	-	-	-	4	4,4
sem informação	1	2,7	3	8,5	-	-	-	-	4	4,4
TOTAL	37	100	35	100	11	100	8	100	91	100

(*) C/Alt. Lab. (com alterações laboratoriais no momento da alta)

DURAÇÃO DA DOENÇA EM DIAS (excluídos os 3 casos de hepatite fulminante e 4 sem informação)



AL (Alterações laboratoriais ao término da observação)

D I S C U S S Ã O

GRUPO A

A HA, HB e HNANB desenvolvem-se manifestando os mesmos sintomas e sinais clínicos, o que as torna clinicamente indistinguíveis se considerarmos apenas estes dados. É bastante difundido que o VHA tende a desencadear doença mais branda que o VHB, mas também é verdade que esta infecção é mais freqüente em crianças e adultos jovens. Esta incidência etária por si só constitui um fator importante no processo evolutivo. Quanto ao sexo, não encontramos predomínio significativo em nenhum grupo com exceção do B, onde predominavam mulheres. Na doença autolimitada de adultos e crianças com HA, as alterações nos níveis das transaminases raramente excedem a 3 semanas; ao contrário, na HB, usualmente vai além de 30 dias e tipicamente persiste por muitos meses (Giles e Krugman, 1972).

O prognóstico da HA parece razoavelmente definido. Nos nossos casos, a evolução para a cura ficou comprovada bioquimicamente em 30 dentre 37 pacientes. Aqueles que não curaram durante o período de observação, deixavam pouca dúvida quanto ao término da doença, pois as alterações eram discretas e seguiam um ritmo regressivo esperado, na direção da normalidade. Os quatro pacientes que apresentaram recidiva foram biopsiados e o quadro histopatológico não deixou qualquer dúvida quanto ao prognóstico favorável. Gruen e cols. (1982) observaram 5 pacientes de HA com recidiva e características muito semelhantes às que descrevemos nos nossos. Todos se curaram ao final de 6 meses e a biópsia hepática realizada em um deles mostrou um quadro histopatológico de hepatite viral aguda. Estes achados estão em consonância com a observação de que a HA não evolui para doença hepática

crônica (Mathiesen, Harot e cols., 1980; Mathiesen, Skinhøj e cols., 1980). Por outro lado, o desenvolvimento de testes sorológicos para HA tornou claro que este tipo de virus pode desendear formas clínicas fulminantes (Mathiesen e Skinhøj e cols., 1980), como ocorreu com um dos nossos pacientes (caso 52) de 5 anos de idade que evoluiu para o ôbito. Um dos fatores que se supõe influenciar no agravamento do quadro é a ocorrência de infecções mistas do VHA com o VHB (Piazza e cols., 1982; Mathiesen e Skinhøj e cols., 1980). No nosso paciente com hepatite fulminante nenhum marcador da HB foi encontrado.

Na análise bioquímica de nossos pacientes, da mesma forma que Koff e cols. (1982) os quais estudaram uma população hospitalar de São Paulo composta de casos com HA e HNANB, tivemos dificuldades na interpretação dos resultados, pelo predomínio de crianças no grupo A. Esta ocorrência impossibilita a discriminação entre fatores virais ou etários, que influenciaram na diferença dos achados bioquímicos dos dois grupos.

Valores de bilirrubina menores que 10mg e particularmente menores que 5mg eram mais frequentemente observados no grupo A do que no grupo B. Como o grupo C mostrou uma distribuição mais regular nos diferentes limites e também por causa do pequeno número de casos, não era possível afirmar ou negar alguma diferença em relação a ele. Outros autores não notaram diferenças quando compararam a HA com HNANB (Dienstag e cols., 1977; Papaevangelou e cols., 1979; Mathiesen e Skinhøj e cols. 1980) e HA (Papaevangelou e cols., 1979; Mathiesen e Skinhøj e cols., 1980; Prince, 1982). Da mesma forma que eles, não observamos variação significativa nos níveis de transaminases entre os diversos grupos.

Talvez pelo maior número de pacientes jovens em idade de crescimento ôsseo, no grupo A, a fosfatase alcalina tenha alcançado valores mais altos com maior frequência que o grupo B.

Os grupos C e D parecem mostrar uma distribuição mais uniforme de seus pacientes nos diversos níveis enzimáticos, mas talvez esta afirmação careça de significado, pelo número reduzido de casos.

Os resultados da pesquisa da IgM, na maioria das vezes obedeceram aos padrões conhecidos da curva clássica de uma imunoglobulina de classe IgM, isto é, ela era fortemente positiva na fase inicial da doença, caindo seus níveis no decorrer do tempo. De um modo geral, a presença de IgM no soro não pôde ser acompanhada até a negatificação, com poucas exceções. Mas, enquanto durou nossa avaliação, pudemos notar algumas diferenças na resposta deste anticorpo em alguns pacientes. Foi-nos possível aferir, por exemplo, que a negatificação da IgM podia ser tão precoce quanto em 17 dias de evolução da doença e tão tardia quanto 11 meses, embora nesses casos fossem fracamente positivas. Outros autores utilizando RIE (Lemon e cols., 1980) ou ELISA (Roggendorf e cols., 1980; Moller e Mathiesen, 1979; Locarnini e cols., 1979) encontraram títulos baixos que persistiram por um prazo em torno de 3 a 5 meses e mesmo tão longo quanto 12 meses (Roggendorf e cols., 1980; Feinstone e Purcell, 1980; Flehmig e cols., 1979). As observações de Storch e cols. (1982) são as que mais se aproximam das nossas. Eles encontraram níveis altos por 3 a 5 meses depois dos primeiros sintomas, mas níveis "borderline" persistiram até 345 dias.

O emprego de diferentes métodos, mais ou menos sensíveis, constitui um fator importante na discrepância dos resultados. Roggendorf e cols. (1980) compararam 3 métodos em soros colhidos em momentos diferentes do início da doença. O soro colhido no 30º dia foi positivo com 2 métodos. Com 41 a 90 dias a imunoglobulina foi demonstrada com o 1º mêtodo em 47% dos pacientes; em 94% com o 2º e com 82% com o 3º.

O encontro de IgM específica para HA, na fase de

convalescença da doença, impõe um risco da doença ser falsamente diagnosticada em pacientes que adoeceram com hepatite não A logo depois da infecção tipo A clínica ou subclínica. Isto pode explicar inclusive o encontro simultâneo de marcadores de HA e HB, ou associação com HNANB (Neurath e cols., 1980) a qual se tem designado de infecção mista.

Da mesma forma que Lemon (1980) não encontramos nenhuma correlação significante entre o título de IgM anti-HAV e o máximo de bilirrubinas e de transaminases elevadas, exceto a coincidência natural do início da doença com estes 2 parâmetros, já que os anticorpos se formam antes da doença tornar-se clinicamente aparente (Roggendorf e cols., 1980; Bradley e cols., 1979).

O encontro de anti-HBc em 2 pacientes (casos 45 e 77) com HA parece um achado razoavelmente comum. Num grupo de doadores de sangue de Maceió, 18,7% tinha anti-HBc como único marcador da HB; em uma outra avaliação realizada no Rio de Janeiro, o anti-HBc sozinho foi encontrado em 15,7% de hansenianos e em 16,4% de pessoas sadias (Yoshida, 1983).

GRUPO B

A distribuição dos pacientes do grupo B nas diversas faixas etárias, foi mais ampla do que a do grupo A. A maior parte dos pacientes situava-se acima de 21 anos com predomínio na terceira década da vida. Tendência inversa foi observada no primeiro grupo. Apesar disto, a HB na nossa amostra não poupou crianças e pessoas na segunda década. Repetimos agora o que dissemos antes, isto é, o fator etário possivelmente influenciou nos resultados bioquímicos. Esta talvez seja a razão pela qual encontramos valores de bilirrubina

nas mais elevados neste grupo do que no grupo A e seria também a explicação para o encontro de níveis menores de fosfatase alcalina, porque os pacientes do grupo B, já não se encontravam na grande maioria, em idade de crescimento. Os outros autores que não observaram diferenças nos dados bioquímicos quando compararam a HB com HA e HNANB (Papaevangelou e cols., 1979; Mathiesen e Skinhøj, 1980; Prince, 1982), estudaram grupos de pacientes que não incluíam crianças.

Quando iniciamos o estudo dos marcadores da HB, começamos a pesquisa do AgHBs e do anti-HBs por HAPR e HAP respectivamente, por falta de recursos para utilizar métodos mais sensíveis. Esta escolha nos deu a oportunidade de compararmos a hemaglutinação com o RIE que passou a ser o método utilizado em nosso trabalho. A diferença de sensibilidade que observamos entre o HAPR (68,5% de positividade) e o RIE (88,5%) já é largamente difundida. Nossa discussão versará, por esta razão, a partir da pesquisa pelo RIE.

A interpretação dos resultados sorológicos nos permite dizer que todos os pacientes do grupo B encontravam-se em estágios variáveis de infecção pelo vírus. Esta era denunciada pela presença de anti-HBc, em todos, ao lado do AgHBs o qual não estava presente em um (caso 57). Neste paciente a conversão do AgHBc para anti-e nos assegurou o diagnóstico etiológico, do quadro clínico apresentado. Ele teve sua primeira coleta de sangue realizada na 6ª semana da doença. Nesta ocasião o anti-HBs já estava presente no soro. O anti-e surgiu na 8ª semana da doença. Tratava-se de um caso clínico em fase de convalescença em que o antígeno desaparece do soro e os anticorpos tomam lugar.

Segundo Hoofnagle e Seeff e cols. (1978), a simultaneidade do AgHBs com o anti-HBc significa que estes pacientes encontram-se em estado de infecção aguda e, mais que isto, em replicação viral. O anti-HBc surge precocemente na

infecção pelo VHB. Embora depois do AgHBs, ele também aparece durante o período de incubação (Vanderveld, 1978). Nos nos casos sempre esteve presente na primeira amostra de soro de todos os pacientes, sendo 17 semanas o tempo mais tardio de nossa observação, sem incluímos os pacientes (casos 120 e 130) nos quais o anti-HBc foi detectado após 2 anos de evolução da DHC. Em estudo experimental, Hoofnagle e cols. (1973), empregando o método de RIE, verificaram a persistência do anti-HBc por um tempo superior a 3 anos, período que durou sua observação. Comparando-o com o anti.HBs, ele é mais prevalente e pode persistir mais tempo (Almeida e cols., 1971). Ambos, o anti-HBs e o anti-HBc, são anticorpos de longa duração e por esta razão, sua presença sugere mas não prova o diagnóstico de HB aguda (Hoofnagle, 1983).

O estudo da prevalência do AgHBe em soro AgHBs positivo mostra resultados variáveis dentre os diversos autores e isto pode ser atribuído ao momento precoce ou tardio em que a primeira amostra de soro é colhida, assim como a maior ou menor sensibilidade do método empregado. Durante o estãgio inicial da infecção existe coincidência entre a presença do AgHBe com o aumento e o declínio do AgHBs.

Dentre os 35 pacientes do grupo B, o AgHBe foi detectado por ID em quatro (11,4%). É um percentual baixo sem nenhuma dúvida, quando comparamos com outros resultados obtidos por RIE o qual se mostrou 500 a 1000 vezes mais sensível que a ID (Aldershive e cols., 1980; Howard e Zuckerman 1979). No entanto, quando se emprega um único método, por exemplo ID, diferenças grandes como 5,7% (Aldershive e cols., 1980); 11,4% (nos nossos casos) e 50% (Mushwar e cols., 1981), faz-nos acreditar na influência da variação no tempo da coleta do soro.

Em dois pacientes (casos 105 e 95) o AgHBe foi detectado na primeira amostra colhida (3ª e 15ª semanas de doença), e negatizou na 4ª e 17ª semanas respectivamente. Du

rante o estágio inicial da infecção experimental realizada por Mushwar e cols. (1981), o AgHBe foi detectado dentro de 3 a 5 dias em seguida ao aparecimento do AgHBs. Em experiência clínica, ele foi invariavelmente detectado na primeira amostra obtida na admissão ao hospital e raramente em amostras de uma a duas semanas depois (Howard e Zuckerman, 1979). A persistência por tempo prolongado, em geral em torno de 10 semanas de evolução, tem sido apontada como indicador de DHC (Aldershivile e cols., 1982; Mushwar e cols., 1981; Sherlock, 1976; Alberti e cols., 1978), porém a afirmação de que ele estã mais freqüentemente associado a HCA do que a HCP (Sherlock, 1976) não é unânime. Há quem considere freqüência similar nas duas formas de hepatite (Alberti e cols., 1978). Nos dois casos de HCA de nossa casuística o AgHBe estava presente depois de 2 anos de doença.

A histopatologia hepática de um de nossos pacientes, em quem o AgHBe persistiu por 15 semanas (caso 95), tinha o aspecto muito sugestivo de HCP, embora não pudéssemos atravês daquela biópsia (realizada na 38ª semana de doença) afastarmos o diagnóstico de HCA. O acompanhamento da evolução deste quadro histopatológico é de considerável importância, levando em conta que a detecção do AgHBe pode ser considerada de valor limitado em casos individuais como um marcador de severidade da lesão hepática.

Um outro aspecto importante em relação ao AgHBe refere-se à contagiosidade. A esposa de um paciente (caso 94) contraiu hepatite tipo B clínica cerca de 2 meses depois dele nunca tendo apresentado AgHBe. Ao contrário dele, que nunca desenvolveu anti-HBs, nela este anticorpo estava presente em níveis muito baixos desde a primeira amostra, juntamente com o AgHBs. A partir deste fato, pensamos que a presença do anti-HBs nela marcava o desenvolvimento de uma imunidade que permitiu a autolimitação da doença. A história epi

demiológica deste caso estaria dentro dos padrões daqueles que consideraram a presença do AgHBe como indicador de infectividade (Mushwar e cols., 1981, King, 1982). Num caso como este, é difícil concluir acerca do mecanismo de transmissão da doença mesmo considerando o contágio direto. Já se demonstrou que tanto a saliva como o sêmem é capaz de transmitir a doença a animais de laboratório (Alter e cols., 1977), embora a presença isolada do AgHBs em secreções não demonstre sua infectividade. Especificamente neste paciente, a saliva não foi examinada por outro método diferente do ELISA, o qual, pelo menos com a técnica que empregamos, não se mostrou eficiente para detecção do AgHBs em secreção salivar, da mesma forma que a HAPR. Ao contrário, pelo RIE provamos positividade na saliva em 83% de 12 casos com antigenemia presente. Isto poderia ser explicado pela maior sensibilidade do mêtodo e, portanto, com maior capacidade para detectar títulos menores. Wong e cols. (1976) utilizando o mesmo método, encontraram o antígeno na saliva em 44% de 25 pacientes com HB e também em 3 dentre 5 portadores crônicos.

Numa outra paciente (caso 105) em quem o AgHBe negativou precocemente não pudemos acompanhar a evolução clínica, porque o último contato no ambulatório se deu no 43º dia de doença.

Da mesma forma que nos casos de Howard e Zuckerman (1979), em nenhum destes dois pacientes que desenvolveram antigenemia detectou-se o anti-HBe. A soroconversão para anti-HBe seguindo-se ao clareamento do AgHBe indica um curso natural da doença. Já o seu aparecimento tardio pode fazer supor um curso prolongado ou de HCP (Norkhans e cols., 1982; Aldershive e cols., 1982).

Em dois pacientes (casos 32 e 57) nos quais se detectou o anti-HBe, este estava presente quando o AgHBs e o AgHBe já haviam desaparecido do soro. Em ambos, a doença foi auto

limitada, fato que parece condizente com a maioria desses achados. Uma persistência menor do AgHBs também foi observada em pacientes com soroconversão para anti-HBe quando comparada com aqueles que apresentavam antigenemia e persistente (Babes e cols., 1981).

Conforme descrevemos antes, a análise histopatológica de 6 pacientes deste grupo revelou estágio agudo da doença em três e em um o diagnóstico era de uma possível hepatite crônica persistente. Neles, a pesquisa do AgHBs através da coloração pela orceína de Shikata foi negativa.

A evidência de grandes quantidades de AgHBs nos cortes histológicos em pacientes com hepatite aguda se dá num estágio pré-clínico e pré-necrótico da doença (Bianchi e cols., 1979 e Hoofnagle e Michalak e cols., 1978). Em estudo experimental com chimpanzês, Hoofnagle e cols. (1978), utilizando ME e IF, concluíram que os referidos antígenos desaparecem dos hepatócitos quando as transaminases se elevam no soro. Esta não é a época que a maioria dos pacientes com hepatite procura nossos hospitais. Mesmo quando o fazem na primeira semana, não é o momento em que indicamos biópsia. Se o fizéssemos, talvez conseguíssemos detectar os antígenos como Alberti e cols. (1976) que os encontraram em 6 dentre 9 casos de hepatite aguda na primeira semana de doença, mas não conseguiram demonstrá-los em outros 9, quando a doença ia pela 4ª a 5ª semanas. Da mesma forma que Bianchi e cols., não conseguimos detectar os antígenos no tecido em casos agudos, mesmo no momento máximo de doença. Ray e Desmet (1976) examinando casos agudos encontraram pouco ou nenhum antígeno no fígado.

A maior frequência de detecção dos antígenos HBs e HBc em material de tecido hepático refere-se aos casos de evolução crônica da doença (Trepo e Robert, 1976; Nowolawski e cols., 1975; Thonsen e Clausen, 1983; Alberti e cols., 1976; Ray e Desmet, 1976). Nos dois pacientes de evolução crônica

que descrevemos (casos 120 e 130), foi possível demonstrar a presença de AgHBs nos cortes histológicos de fígado através da colocação pela orceína. Um outro paciente (caso 88) com quadro clínico de doença hepática crônica e antígeno positivo não pode ser submetido à punção biópsia hepática pois a atividade de protrombina se situava bem abaixo do limite de segurança para tal procedimento. A presença de AgHBs no soro de um paciente com HCA tem sido considerada como indício de que a lesão hepática é consequência de infecção pelo VHB (Brecht e cols., 1980). Thonsen e Claussen (1983) estudaram 1539 biópsias consecutivas pela orceína de Shikata, nas quais demonstraram o AgHBs em 2,3%. O antígeno não foi encontrado em nenhum caso de hepatite aguda e dentre as outras formas de doença hepática a frequência de positividade maior era relacionada à hepatite crônica. Eles concluíram que a coloração de cortes histológicos de fígado pela orceína de Shikata é um método inadequado para detecção deste marcador em casos de hepatite aguda, o que está de acordo com os nossos achados.

Se considerarmos apenas os casos fulminantes a mortalidade neste grupo foi de 5,7% e se incluirmos o caso de óbito por evolução crônica, este índice passa a 8,5%. De qualquer forma, maior que no grupo A (2,7%), como observado por outros autores (Mathiesen e Skinhøj e cols., 1980; Norkrans e cols., 1982).

A associação de HB com outros agentes infecciosos como o agente delta, pode ser responsável por alguns casos de hepatite fulminante (Tabor e cols., 1983; Redeker, 1983; Hoofnagle, 1983). O agente delta só infecta pessoas que sejam AgHBs positiva e pode causar hepatite aguda ou crônica, porém é comum em politransfundidos ou dependentes de drogas (Hoofnagle, 1983). Nossos pacientes que desenvolveram hepatite fulminante não tinham fatores epidemiológicos comumente implicados com esta infecção concomitante.

A conversão simultânea de AgHBs para anti-HBs com a do AgHBe para anti-e foi observada por Tabor e cols. (1982) em um caso de hepatite fulminante. No seu paciente a mudança no perfil sorológico se deu durante o desenvolvimento do coma. O aparecimento precoce do anti-HBs no curso da doença com clareamento do AgHBs na hepatite fulminante tem sido atribuído à formação de imunocomplexos (Trepo e Robert, 1976; Woolf e cols., 1976). Não foi possível acompanhar regularmente a evolução dos marcadores de HB nos nossos casos de hepatite fulminante dado o curto tempo de sobrevivência, mas ainda assim foi possível detectar o anti-HBe na amostra inicial de um dos pacientes (caso 1), porém não havia sinal de conversão do AgHBs para o anti-HBs.

GRUPO C

Este grupo reúne 11 pacientes, cujo diagnóstico de HA e HB pode ser afastado pelo estudo de marcadores. Um deles (caso 81) era imune ao VHB, pois no 3º dia da doença a pesquisa do anti-HBs e anti-HBc foi positiva porém do AgHBs negativa.

Nos nossos pacientes excetuando o caso nº 46, de 13 anos, o qual nos pareceu ser HA pela idade, dados epidemiológicos e tempo tardio (50º dia) em que a IgM específica para HA foi pesquisada, a idade variou de 20 a 60 anos, com média de 38 anos, dados que coincidem com os achados de outros autores (Diensttag e cols., 1977 e Bamber e cols., 1981). Mathiesen e Harot e cols. (1980) encontraram 6 casos dentre 7 mulheres em idade superior a 60 anos e Iwarson e cols. (1979) descreveram dois casos (1 homem e 1 mulher) de 55 e 60 anos de idade. Excluindo o caso suspeito de ser HA no nosso grupo, tínhamos 4 homens e 6 mulheres.

Além do paciente de nº 46, dois outros (casos 42 e 90) também tiveram sua IgM específica pesquisada tardiamente, 36º e 51º dia de doença. É verdade que a IgM pode persistir positiva por muito tempo, mas tivemos a oportunidade de acompanhar a negatificação desta imunoglobulina no 17º dia em um paciente (caso 61) e com mais de 2 meses em outro (caso 49). A idade nestes 2 pacientes, 60 e 46 anos, favorecia o diagnóstico de HNANB.

Freqüentemente pensamos em HNANB quando houve exposição parenteral, particularmente transfusão sanguínea. Porém muitas vezes, desconhecemos qualquer dado epidemiológico implicado na sua transmissão. Na primeira situação a doença se confunde com a HB. Dois de nossos pacientes receberam transfusão sanguínea. As informações epidemiológicas dos outros eram pouco convincentes. A exemplo disto, temos um paciente que fez uso de injeção um ano antes e dois que relataram uso de drogas, mas estes fatos não coincidem no tempo para ter significado epidemiológico. Um outro paciente apresentou um quadro clínico "semelhante" dois anos antes, ocasião em que foi submetido a biópsia hepática, a qual não tivemos acesso. Na doença atual, a histologia demonstrou um quadro típico de hepatite viral aguda. Na literatura, encontramos experiências diversificadas no que se refere a evidências epidemiológicas nos relatos de casos de HNANB. Bamber e cols. (1981) encontraram 8 casos com exposição parenteral no seu grupo de 12 e Koff e cols. (1982), em São Paulo, encontraram em 13 (43%) de 30 pacientes com HNANB. Mathiesen e Harot e cols. (1980) referiram-se a 2 casos de injeção e 1 transfusão em 7 pacientes estudados, mas em outro grupo com 6 pacientes (Mathiesen e Skinhøj e cols., 1980), este dado era desconhecido em todos. Este fato tem levantado a hipótese também de transmissão fecal-oral na HNANB (Carreno, 1982).

Outros autores que estudaram HNANB (Mathiesen e Skinhøj e cols. 1980; Dienstag e cols., 1977; Prince e cols., 1974; Papae

vangelou e cols., 1979) não encontraram diferença significativa quanto aos achados bioquímicos de bilirrubinas e transaminases, quando comparados com os da hepatite A e B. Como dissemos antes, nos nossos casos, o estudo comparativo destes parâmetros do grupo C com os dos outros grupos ficou prejudicada pelo pequeno número de casos. Quanto à fosfatase alcalina, pareceu-nos tender a níveis comparáveis aos do grupo B, o que está de acordo com a faixa etária mais elevada deste grupo.

Nenhum paciente deste grupo C mostrou sinais clínicos de doença aguda grave ou características de doença hepática crônica. No entanto, foi nele que se concentrou, proporcionalmente, o maior número de pacientes que ainda apresentava alterações nos níveis de transaminases e/ou bilirrubinas quando os vimos pela última vez (Tabela 1; 2, 3, 4). Nesses casos, o período de observação durou de uma a 19 semanas, com média de 7, com exclusão do paciente de número 46 que apresentava algumas características de HA. Nos outros cinco, nos quais acompanhamos a cura clínica, esta se deu num prazo que variou de 3 a 22 semanas em média 9. A maioria dos achados da literatura demonstra um curso mais prolongado da HNANB (Berg, 1981; Mathiesen e Skinhøj e cols., 1977; Alter e cols., 1978; Bermann e cols., 1979; Bamber e cols., 1981; Purcell e cols., 1976) quando comparado a HA. Como perdemos a oportunidade de acompanhar mais de 50% de nossos casos até a cura, podemos dizer apenas que a média nestes cinco casos ultrapassa o limite onde a concentração do maior número de pacientes do grupo A se faz.

O paciente mais jovem sobre quem recaiu a suspeita clínica de HA, desenvolveu um 2º pico de elevação das bilirrubinas e das transaminases, sendo então submetido à punção biópsia hepática. A histopatologia mostrou um aspecto de necrose tipo "bridging" que não é um achado comumente descrito em HA, mas tem sido assinalado na HNANB (Prince e cols.,

1974). Dienes e cols. (1982) consideraram importante a predominância do efeito citopático sobre o infiltrado linfocítico no quadro histopatológico da HNANB quando comparado com outras formas de hepatite. Esta pareceu-nos ser uma razão para incluir nosso paciente no grupo C, mas não suficiente para analisar seus achados laboratoriais conjuntamente com os outros componentes deste grupo. Nós o acompanhamos por 117 dias, mas nesta ocasião, a cura ainda não havia sido comprovada pelos achados laboratoriais, o que mostrava uma tendência ao prolongamento do curso evolutivo, como tem sido observado na HNANB ao contrário de HA (Mathiesen e cols., 1980). Este caso mostra bem as enormes dificuldades diagnósticas que ainda hoje enfrentamos apesar de podermos excluir os pacientes com HA e HB. Se nossos pacientes deste grupo, assim como os casos designados por outros autores como tendo HNANB são devidos ao mesmo agente etiológico, permanecem por serem esclarecidos. São designados de HNANB aqueles que não são tipo A ou B, e dos quais se podem excluir outras causas de hepatite, por exemplo, tóxicas, VICM e VEB. Dentro desta linha de exclusão, reduziremos os casos de etiologia não classificada quando testes para HNANB estiverem disponíveis.

GRUPO D

De maneira geral, o clínico tem pouco ou nenhum conhecimento dos problemas ligados à realização de exames laboratoriais. Este fato influenciou-nos para constituir um quarto grupo de pacientes aos quais a literatura não se refere e, no entanto, representa uma dificuldade que não é incomum no nosso trabalho. São os pacientes cujos resultados sorológicos, por si sós, são inconclusivos e não permitem uma

discriminação etiológica. A julgar pela positividade da IgM, cinco dentre oito dos que compõem este grupo poderiam ser diagnosticados como tendo HA, mas com reatividade inespecífica para AgHBs no primeiro deles (caso 101) já que este foi o único marcador de HB detectado. Este resultado falso positivo pode ser importante causa de erro diagnóstico quando se usa este marcador como único elemento diagnóstico (Hoofnagle, 1983). No segundo deles (caso 56), a presença do anti-HBc com o anti-HBs foi detectada na primeira amostra, mas estes marcadores tornaram-se negativos na segunda. Estes são anticorpos de longa duração e não poderiam ter desaparecido da circulação na segunda semana da doença. Se sua presença indica uma infecção pelo VHB anterior ao quadro atual, talvez a presente doença fosse devida ao VHA. Para aumentar a curiosidade deste caso, a IgM foi negativa na primeira amostra colhida no 10º dia de doença e se tornou positiva uma semana mais tarde.

Nos outros três pacientes havia sempre positividade de do AgHBs a qual não se confirmava pelo ELISA e quando aplicamos o teste confirmatório, os resultados eram irregulares.

Em dois outros pacientes, a IgM específica para HA foi negativa. Em um deles (caso 66) não havia concordância nos resultados da pesquisa do AgHBs quando se empregavam métodos diferentes e o anti-HBc era negativo em quase todas as amostras. Os resultados mais constantes se referiam ao anti-HBs, o que indica um contato anterior com o VHB. Apesar da IgM para HA ter sido negativa, não podíamos descartar o diagnóstico de HA pelo fato da imunoglobulina ter sido pesquisada numa fase tardia da doença (90º dia).

Em outra paciente (caso 91) o AgHBs não pode ser confirmado por ELISA, nem pelo teste confirmatório, o mesmo ocorrendo com o anti-HBc quando se repetiu o teste pelo mes-

mo método. Por esta razão, ele deveria ser classificado dentro do grupo C. Finalmente, o último paciente deste grupo (caso 65) tinha IgM para HA positiva numa primeira pesquisa a qual não foi confirmada ao ser retestada. Nele, os resultados da pesquisa do AgHBs mostraram resultados contraditórios. Os resultados mais definidos são os relativos aos anticorpos anti-HBc e anti-HBs, mas no que se refere ao anti-HBe a resposta flutuante tornou-se pouco convincente.

Vistas as dificuldades que podem surgir na interpretação do perfil sorológico, cabe agora questionar a respeito das causas de resultados desconhecidos. Em primeiro lugar o tempo dentro da evolução da doença é importante para o diagnóstico porque os marcadores, seja quais forem, têm um tempo de permanência na circulação e a presença ou ausência deles em tempo inadequado pode apontar a irreabilidade do achado. A presença de elementos estranhos leva à inespecificidade de reações, fato bastante conhecido que conduz a resultados falso-positivos. O RIE, universalmente considerado o teste de maior sensibilidade, não é infalível. Vários fatores influenciam em seus resultados: a qualidade de técnica, onde entra a pessoa do técnico; do material descartável, mas na verdade reaproveitado; da integridade de máquina sofisticada, por exemplo o contador gama; e mais ainda do emprego de material como o radioativo que pode alcançar o extremo de sensibilidade, levando, às vezes, a captação de material não específico.

Diante dos resultados sorológicos discutidos acima, como classificaríamos estes pacientes? As suposições baseadas no perfil sorológico devem encontrar reforço nos dados clínicos, dos quais são importantes: a epidemiologia, a idade e o curso evolutivo. Conforme se pode observar nas tabelas VIII a X há uma certa dificuldade em se julgar os achados bioquímicos deste grupo em comparação aos de etiologia

esclarecida em que pese o número pequeno de casos. Ainda as sim, observa-se uma leve tendência a seguir os padrões de HA e, se isto se confirmasse, sō se poderia explicar por um maior número de casos desta forma de hepatite.

C O N C L U S Õ E S

1. A pesquisa da IgM específica para HA mostrou-se um ex.
celente método diagnóstico. Com apenas uma amostra de
soro pode-se firmar o diagnóstico na grande maioria das
vezes.
2. A utilização de 3 marcadores sorológicos (AgHBs; anti-
HBc e anti-HBs) assegurou um diagnóstico preciso para
HB principalmente em estudos evolutivos.
3. Baseada em dados clínicos e bioquímicos, a diferenciação en
tre HA, HB e hepatite não classificada foi impossível. As
diferenças encontradas nos nossos grupos podem ser ex
plicadas pela idade.
4. Apesar do curso da doença ter sido mais benigno na HA,
ocorreu também forma fulminante, mas não DHC.
5. Não houve correlação significativa entre positividade
de IgM anti-VHA e níveis máximos de bilirrubinas e de
transaminases.
6. O AgHBe permanecendo mais tempo na circulação fez sus
peitar de DHC; além disto sua negatificação particular
mente quando acompanhada de conversão para anti-HBe foi
indicativa da presença de doença auto-limitada.
7. O AgHBs foi freqüentemente encontrado na saliva de pes
soas com antigenemia HBs positiva (83% de 12 casos) e por
esta razão esta secreção pode representar um importante modo de
transmissão da doença, ainda que sua presença não constitua afirmação.
8. A demonstração do AgHBs pela orceína e pela ME em cor
tes histológicos de fígado, só foi observado em casos
de evolução crônica definida da doença.
9. O prognóstico na HB foi mais sombrio, com mortalidade
mais elevada e desenvolvimento de DHC.

10. No grupo da hepatite não classificada, nenhum paciente desenvolveu doença aguda grave e dentro do período de observação nenhum desenvolveu DHC. Neste grupo, a evolução mais arrastada foi suspeitada, mas não comprovada.
11. Apesar de sensíveis e modernos testes sorológicos estarem disponíveis para o diagnóstico de HA e HB permanecem dificuldades técnicas que deixam muitos casos, mesmo dentre os de HA e HB, sem definição diagnóstica.
12. O diagnóstico foi facilitado quanto mais próximo do início dos sintomas, os marcadores sorológicos foram pesquisados.

S U M M A R Y

Markers of viral hepatitis types A and B were investigated in 91 patients. Results allowed the patients to be classified into 4 groups, the first (37 patients) characterized as hepatitis A, the second (35 patients) as hepatitis B, the third (11 patients) with neither A nor B markers and the fourth (8 patients) with markers that could not be clearly interpreted.

An analysis of clinical and biochemical aspects and of the course of disease revealed that group A included a significantly greater number of children and young adults than group B in which the mean was above 30 years. The latter was also the case in group C but in this as in group D, the number of patients was insufficient for statistical significance to be established.

Analysis of biochemical findings revealed a preponderance of bilirubin levels of 10mg% in group A as opposed to group B. In contrast, alkaline phosphatase levels were higher in group A than in group B. These variations were interpreted as resulting from the mean age difference between the two groups. Transaminases levels (SGOT and SGPT) were not significantly different in the two groups.

Histological examination of liver sections stained with orcein revealed AgHBs in two patients of group B with active chronic hepatitis (ACH) but not in patients with acute hepatitis. Structures resembling AgHBs were found in one patient with chronic hepatitis.

The course of disease was more benign in VHA, not evolving to the chronic type but occasionally leading to the fulminating form. There were no deaths in group C and no

patients showed chronic liver disease (CLD). However, several patients in this group were not followed until cured.

Saliva from 35 patients were tested for the presence of AgHBs by RPHA, ELISA and RIA with positive results in 83% of 12 patients with HBs antigenaemia, for the last test.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTI, A.; REALDI, G.; TREMOLADA, F. and SPINA, GP. - Liver cell surface localization of hepatitis B antigen and of immunoglobulines in acute and chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Clin. Exp. Immunol.* 25:396-402, 1976
- ALBERTI, A.; DIANA, S.; SCULLARD, GH.; EDDLESTON, WF. and WILLIAMS, R. - Full and empty Dane particles in chronic hepatitis B virus infection: relation to hepatitis B e antigen and presence of liver damage. *Gastroenterology* 75:869-874, 1978
- ALDERSHVILE, J.; FRØSNER, GG.; NIELSEN, JO.; HAROT, F.; DEINHARDT, F.; SKINHØJ, PO. and THE COPENHAGEN HEPATITIS ACUTA PROGRAMME - Hepatitis B e antigen and antibody measured by radioimmunoassay in acute hepatitis B surface antigen positive hepatitis. *J. Infect. Dis.*, 141:293-298, 1980
- ALDERSHVILE, J.; DIETRICHSON, O.; SKINHØJ, PO.; KRYGER, P.; MATHIESEN, LR.; CHRISTOFFERSEN, P.; NIELSEN, J.O.; and COPENHAGEN HEPATITIS ACUTA PROGRAMME - Chronic persistent hepatitis: serological classification and meaning of the hepatitis B e system. *Hepatology*, 2:243-246, 1982
- ALMEIDA, JD.; and WATERSON, AP. - The morphology of virus antibody interaction. *Adv. Virus. Res.*, 15:307-338, 1969a
- ALMEIDA, JD.; and WATERSON, AP. - Immune complexes in hepatitis. *Lancet*, 2:983-986, 1969b
- ALMEIDA, JD.; RUBINSTEIN, D. and STOTT, EJ. - New antigen - antibody system in Australia - positive hepatitis. *Lancet*, 2:1225-1227, 1971

ALMEIDA, JD.; ATANASIU, P.; BRADLEY, DW.; GARNIER, PS.; MAYNARD, J.; CHUURS, AW.; VÖLLER, A. and VOLKEN, RH. - Manual for rapid laboratory viral diagnosis. WHO off set publication n° 47:39-46, 1979

ALTER, HJ.; HOLLAND, PV.; PURCELL, RH.; LANDER, JJ.; FEINSTONE, SM.; MORROW, AG. and SCHMIDT, PJ. - Post-transfusion hepatitis after exclusion of commercial and hepatitis-B antigen- positive donors. *Ann. Inst. Med.* 77:691-699, 1972

ALTER, HJ.; HOLLAND, PV.; MORROW, AG.; PURCELL, RH.; FEINSTONE, SM.; and MORITSUGU, Y. - Clinical and serological analysis of transfusion - associated hepatitis. *Lancet*, 2:841-938, 1975

ALTER, HJ.; SEEFF, LB.; KAPLAN, PM.; McAULIFFE, VJ.; WRIGHT, EC.; GERIN, JL.; PURCELL, RH.; HOLLAND, PV. and ZIMMERMAN, HJ. - Type B hepatitis: the infectivity of blood positive for e antigen and DNA polymerase after accidental needle stick exposure. *New Engl. J. Med.*, 295:910-912, 1976

ALTER, HJ.; PURCELL, RH.; GERIN, JL.; LONDON, GWT.; KAPLAN, PM.; McAULIFFE, VJ.; WAGNER, J. and HOLLAND, PV. - Transmission of hepatitis B to chimpanzees by hepatitis B surface antigen - positive saliva and semen. *Infect. and Immun.* 16:928-933, 1977

ALTER, HJ.; HOLLAND, PV.; PURCELL, RH. and POPPER, H. - Transmissible agent in non - A, non - B hepatitis. *Lancet*, 1:459-463, 1978

AVRAMEAS, S. and TERNYNCK, T. - Communication to the Editors. Peroxidase labelled antibody and Fab with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry*, 8:1175-1179, 1971

- BABES, VT.; CEPĂNARU, S.; CEPĂNARU, R. and TANASE, M. -
Investigations on HB_e antigen. Note II. Dynamics of
HB_sAg in acute viral hepatitis, according to HB_eAg
persistence or seroconversion. Rev. Roum. Virol.,
32:187-191, 1981
- BAMBER, M.; MURRAY, AK.; WELLER, I.; MORELLI, A.; SCHEVER, PJ.;
THOMAS, HC. and SHERLOCK, S. - Clinical and
histological features of a group of patients with
sporadic non A, non B hepatitis. J. Clin. Pathol., 34:
1175-1180, 1981
- BANCROFT, WH.; MUNDON, FK. and RUSSELL, PK. - Detection of
additional antigenic determinants of hepatitis B
antigen. J. Immunol., 109:842-848, 1972
- BANCROFT, WH.; SNITBHAN, R.; SCOTT, RM.; TINGPALAPONG, M.; WATSON,
WT.; TANTICHAROENYOS, P.; KARWACKI, JJ. and SRIMARUT,
S. - Transmission of hepatitis B virus to gibbons by
exposure to human saliva containing hepatitis B
surface antigen. J. Infect. Dis. 135:79-85, 1977
- BARKER, LF.; CHISARI, FV.; McGRATH, PP.; DALGARD, DW.; KIRSCHSTEIN,
RL.; ALMEIDA, JD.; EDGINGTON, TS.; PETERSON, MR.; -
Transmission of viral hepatitis, type B, to
chimpanzees. J. Infect. Dis., 127:648-662, 1973
- BASEL, SB. - International Workshop on HB_s antigen subtypes.
Biblioteca Haematologica, 42:1-158, 1976
- BAYER, ME.; BLUMBERG, BS. and WERNER, B. - Particles associated
Australia antigen in serum of patients with leukemia.
Down's syndrome and hepatitis. Nature, 218:1057-1059,
1968
- BERG, PA. - Epidemiologia y clinica de la hepatitis no-A no-B.
Med. Alemana, Buenos Aires, 22:1021-1030, 1981

- BERMAN, M.; ALTER, HJ.; ISHAK, KG.; PURCELL, RH. and JONES, EA. -
The chronic sequelae of non-A, non-B hepatitis.
Ann.Int.Med., 91:1-6, 1979
- BIANCHI, L.; SINGELSEN, M.; STALDER, GA.; and GUDAT, F. -
*Hepatitis cronica B. Relaciones entre el virus
hepatico y la respuesta inmunitaria. Rev.Clin.Esp.*,
152:439-445, 1979
- BLUMBERG, BS.; ALTER, HJ. and VINISH, S. - A "new" antigen in
leukemia sera. JAMA, 191:101-106, 1965
- BORIES, P.; COURSAGET, P.; GOUDEAU, A.; DE GOTT, C.; MAUPAS, P. and
BENHAMON, JP: - Antibody to hepatitis B core antigen
in chronic active hepatitis. *Br.Med.J.*, 1:396-397, 1978
- BRADLEY, DW.; HOLLINGER, FB.; HORBECK, CL. and MAYNARD, JE. -
Isolation and characterization of hepatitis A virus.
Am.J.Clin.Pathol., 65:876-889, 1976
- BRADLEY, DW.; COOK, EH.; MAYNARD, JE.; McCAUSTLAND, KA.; EBERT,
JW.; DOLANNA, GH.; PETZEL, RA.; KANTOR, RJ.; HEILBRUNN,
A.; FIELDS, HA. and MURPHY, BL. - Experimental infection
of chimpanzees with antihemophilic (factor VIII)
materials: recovery of virus-like particles associated
with non-A non-B hepatitis. *J.Med.Virol.* 3:253-269,
1979
- BRADLEY, DW.; FIELDS, HA.; McCAUSTLAND, KA.; MAYNARD, JE.; DECKER,
RH.; WHITTINGTON, R. and OVERBY, LR. - Serodiagnosis
of viral hepatitis A by a modified competitive
binding radioimmunoassay for immunoglobulin M anti-
hepatitis A virus. *J.Clin.Microbiol.*, 9:120-127, 1979
- BRECHOT, C.; TREPO, C.; NINOVA, D.; GOUDEAU, A.; DEGOTT, C.;
MAUPAS, P.; POTET, F. and BENHAMON, JP. - Hepatitis B
core antigen in hepatocytes of patients with chronic
active hepatitis. *Dig.Dis.Sci.* 25:593-596, 1980

- CARRENO, U. - Virus non-A, non-B de la hepatitis. Progressos realizados. *Rev. Clin. Esp.*, 167:139-141, 1982
- CHAUDHURI, AKR.; FOLLETT, EAC. and BURRELL, CS. - Anti-e and vertical transmission of hepatitis B surface antigen. *Br. Med. J.*, 6099:1416-1417, 1977
- CHRISTIANSEN, P.A. - Hepatitis antigen-antibody tests and their clinical significance. *J. Indiana State Med. Assoc.*, 70:865-869, 1977
- COHEN, BJ. - The I_gM antibody responses to the core antigen of hepatitis B virus. *J. Med. Virol.*, 3:141-149, 1978
- COULEPIS, AG.; LOCARNINI, SA. and GUST, ID. - Iodination of hepatitis A virus reveals a fourth structural polypeptide. *J. Virol.*, 35:572-574, 1980
- COUROUCÉ, AM. - Sous types de l'antigène HB_s (Répartition géographique et aspects épidémiologiques) *Rev. Médecine (6-9)*:299-305, 1976
- COUROUCÉ-PAUTY, AM. and PLANÇON, A. - E-antigen and anti-e in two categories of chronic carriers of hepatitis B surface antigen. *Vox Sang.*, 34:231-238, 1978
- DANE, DS.; COMERON, CH. and BRIGGS, M. - Virus-like particles in serum of patients with Australia - antigen - associated hepatitis. *Lancet*, 1:695-698, 1970
- DEINHARDT, F.; HOLMES, AW.; CAPPS, RB. and POPPER, H. - Studies on the transmission of human viral hepatitis to marmoset monkeys. I. Transmission of disease, serial passage and description of liver lesions. *J. Exp. Med.*, 125:673-688, 1967
- DIENES, HP.; POPPER, H.; ARNOLD, W. and LOBECK, H. - Histologic observation in human hepatitis non-A, non-B. *Hepatology*, 2:562-571, 1982

- DIENSTAG, J.L.; FEINSTONE, S.M.; KAPIKIAN, A.Z. and PURCELL, R.H. -
Faecal shedding of hepatitis A antigen. *Lancet*,
1:765-766, 1975
- DIENSTAG, J.L.; ALAAMA, A.; REDEKER, A.G. and PURCELL, R.H. -
Etiology of sporadic B surface antigen-negative
hepatitis. *Ann.Int.Med.*, 87:1-6, 1977
- EDGINGTON, T.S. and RITT, D.J. - Intrahepatic expression of serum
hepatitis virus - associated antigen. *J.Exp.Med.*,
134:871-885, 1971
- FEINSTONE, S.; KAPIKIAN, A.Z. and PURCELL, R.H. - Hepatitis A:
Detection by immunoelectron microscopy of a virus
like antigen associated with acute illness. *Science*,
182:1026-1028, 1973
- FEINSTONE, S.M.; KAPIKIAN, A.Z.; GERIN, J.L. and PURCELL, R.H. -
Buoyant density of the hepatitis A virus-like
particle in cesium chloride. *J.Virol.*, 13:1412-1414,
1974
- FEINSTONE, S.M.; KAPIKIAN, A.Z.; PURCELL, R.H.; ALTER, H.J. and
HOLLAND, P.V. - Transfusion-associated hepatitis not
due to viral hepatitis type A or B. *N.Engl.J.Med.*,
292:767-770, 1975
- FEINSTONE, S.M.; MORITSUGO, Y.; SHIN, J.W.K.; GERIN, J.L. and PURCELL,
R.H. - Characterization of hepatitis A virus, pp.41-48.
In: *Viral Hepatitis*. Edited by VYAS, G.N.; COHEN, S.N. and
SCHMID, R. Franklin Institute Press. San Francisco,
California, 1978
- FEINSTONE, S.M. and PURCELL, R.H. - Non-A, non-B hepatitis. *Ann
Rev.Med.*, 29:359-366, 1978

- FEINSTONE, SM. and PURCELL, RH. - New methods for the serodiagnosis of hepatitis A. *Gastroenterology*, 78: 1092-1093, 1980
- FLEHMIG, B.; RANKE, M.; BERTHOLD, H. and GERTH, HJ. - A solid phase radioimmunoassay for detection of I_g^M antibodies to hepatitis A virus. *J. Infect. Dis.*, 140:169-175, 1979
- FLEHMIG, B. - Hepatitis A virus in cell culture: I - Propagation of different hepatitis A virus isolate in a fetal monkey kidney cell line (Frhk -4). *Med. Microbiol.*, 168:239-248, 1980
- FLEHMIG, B. - Hepatitis A virus in cell culture: II - Growth characteristics of hepatitis A virus in Frhk-4 cells. *Med. Microbiol. Immunol.*, 170:73-81, 1981
- FREI, PC.; DESAULES, M. and KRAFFT, T. - Cell-mediated immune response to purified HBsAg in HBV infection. pp.267-273. In: *Viral Hepatitis*. Edited by VYAS, GN.; COHEN, SN. and SCHMID, R.; Franklin Institute Press. San Francisco, California, 1978
- FRÖSNER, GG.; DEINHARDT, F.; SCHEID, R.; GAUSS-MÜLLER, V.; HOLMES, V.; MOSSELBERGER, V.; SIEGL, G. and ALEXANDER, JJ. - Propagation of human hepatitis A virus in a hepatoma cell line. *Infection*, 7:303-306, 1979
- GALBRAITH, RM.; DIENSTAG, JL.; PURCELL, RH.; GOWER, PH; ZUCKERMAN, AJ. and WILLIAMS, R. - Non-A, non-B hepatitis associated with chronic liver disease in a haemodialysis unit. *Lancet*, 1:951-953, 1979
- GERBER, MN.; SARNO, E. and VERNACE, ST. - Immune complexes in hepatocytic nuclei of HBsAg-positive chronic hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, 294:922-925, 1976

- GERBER, MN.; ZAPPI, T.; VERNACE, SJ. and PARONETTO, F. - Antibodies to hepatitis B core antigen in hepatitis B surface antigen positive and negative chronic hepatitis. *J. Infect. Dis.*, 135:1006-1009, 1977
- GERING, JL.; FORD, EC. and PURCELL, RH. - Biochemical characterization of Australia antigen. Evidence for defective particle of hepatitis B virus. *Am. J. Path.*, 81:651-661, 1975
- GILES, JP. and KRUGMAN, S. - Differential diagnostic features between infections with type A and B viruses. *Am. J. Dis., Child.*, 123:281-282, 1972
- GOUDEAU, A.; COURSAGET, P.; DRUCKER, J.; MAUPAS, PH.; BORIE, PH. and BENHAMON, JP. - HBsAg-negative chronic active hepatitis related to hepatitis B virus. *Med. Microbiol. Immunol.*, 166:231-237, 1978
- GRAVELLE, CR.; HORNEBECK, CL.; MAYNARD, JE.; SCHABLE, CA.; COOK, EH. and BRADLEY, DW. - Hepatitis A: Report of a common source outbreak with recovery of a possible etiologic agent. II - Laboratory studies. *J. Infect. Dis.*, 131:167-171, 1975
- GRUER, LD; McKENDRICK, MW.; BEECHING, NJ. and GEDDES, AM. - Relapsing hepatitis associated with hepatitis A virus. *Lancet*, 11:163, 1982
- GUDAT, F.; BIANCHI, L.; SONNABEND, W.; THIEL, G.; AENISHAENSLI, W. and STALDER, GA. Pattern of core and surface expression in liver tissue reflects state of specific immune response in hepatitis B. *Lab. Invest.*, 32:1-9, 1975

- HOLLINGER, FB.; AACH, RD.; GITNIC, GL.; ROCHE, JK. and MELNICK, JL. - Limitation of solid-phase radioimmunoassay for HBAG in reducing frequency of post-transfusion hepatitis. *N.Engl.J.Med.*, 289:385-391, 1973
- HOLLINGER, FB.; BRADLEY, DW.; MAYNARD, TE.; DREESMAN, GR. and MELNICK, JL. - Detection of hepatitis A viral antigen by radioimmunoassay. *J.Immunol.*, 115:1464-1466, 1975
- HOLMES, AW.; WOLFE, L.; ROSENBLAT, H. and DEINHARDT, F. - Hepatitis in marmosets: induction of disease with coded specimens from a human volunteer study. *Science*, 167:816-817, 1969
- HOLMES, AW.; DEINHARDT, F.; WOLFE, L.; FRÖESNER, G.; PETERSON, D. and CASTO, B. - Specific neutralization of human hepatitis type A in marmoset monkeys. *Nature(London)*, 243:419-420, 1973
- HOOFNAGLE, JH.; GERETY, RJ. and BARKER, LF. - Antibody to hepatitis B-virus core in man. *Lancet*, 2:869-873, 1973
- HOOFNAGLE, JH.; GERETY, RJ. and BARKER, LF. - Antibody to hepatitis B core antigen A sensitive indicator of persistent viral replication. *N.Engl.J.Med.*, 290: 1336-1340, 1974
- HOOFNAGLE, JH.; GERETY, RJ.; TABOR, E.; FEINSTONE, SM.; BARKER, LF. and PURCELL, RH. - Transmission of non-A, non-B hepatitis. *Ann.Int.Med.*, 87:14-20, 1977
- HOOFNAGLE, JH.; MICHALAK, T.; NOWOSLAWSKI, A.; GERETY, RJ. and BARKER, LF. - Immunofluorescence microscopy in experimentally induced, type B hepatitis in chimpanzees. *Gastroenterology*, 74:182-187, 1978

- HOOFNAGLE, JH.; SEEFF, LB.; BALES, ZB.; GERETY, RJ. and TABOR, E -
Serologic responses in hepatitis B. pp.219-242. In:
Viral Hepatitis. Edited by VYAS, GN.; COHEN, SN. and
 SCHMID, R. Franklin Institute Press. San Francisco,
 California, 1978
- HOOFNAGLE, JH. - *Serodiagnosis of acute viral hepatitis.*
Hepatology, 3:267-268, 1983
- HOWARD, CR. and ZUCKERMAN, AJ. - *Core antigen and circulating
 anti-core antibody in hepatitis B infection.*
J. Immunol. Methods., 14:291-301, 1977
- HOWARD, CR.; ZANETTI, AR. and ZUCKERMAN, AJ. - *The nature of
 hepatitis B e antigen.* *J. Med. Virol.* 3:59-66, 1978
- HOWARD, CR, and ZUCKERMAN, AJ. - *The separation and analysis of
 hepatitis B e antigen.* *J. Med. Virol.*, 4:303-314, 1979
- HUANG, S. - *Immunohistochemical demonstration of hepatitis B
 core and surface antigen in paraffin sections.*
Laborat. Invest., 33:88-95, 1975
- IMAI, M.; YAMASHITA, Y.; MIYABAWA, Y. and MAYUMI, M. -
*Haemagglutination inhibition assay of the common and
 subspecificities of Australia antigen.* *Immunology*,
 27:871-878, 1974
- IRWIN, GR.; ALLEN, RG.; SAGAL, HG.; ALLEN, AM.; PUTNAK, JR.; CANNON,
 HG. and TOP, FH Jr. - *Serodiagnosis of hepatitis B virus
 infection by antibody to core antigen.* *J. Infect. Dis.*,
 136:31-36, 1977
- IWARSON, S.; LINDBERG, J. and LUNDIN, P. - *Progression of
 hepatitis non-A, non-B to chronic active hepatitis.*
A histological follow-up of two cases. *J. Clin. Pathol.*,
 32:351-355, 1979

- JÓZWIAK, W.; KÓSCIELAK, J.; MADALINSKI, K.; BRZOSKO, WJ.;
NOWOSLAWSKI, A. and KLOCZEMIAK, M. - RNA of Australia
antigen. *Nature*, 229:92-94, 1971
- KAPIKIAN, AZ.; WYATT, RG.; DOLIN, R.; THORNHILL, TS.; KALLICA, AR.
and CHANOCH, RM. - Visualization by immune electron
microscopy of a 27 nm particle associated with acute
infections nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.*,
10:1075-1981, 1972
- KAPLAN, PM.; GREMAN, RL.; GERIN, JL.; PURCELL, RH and ROBINSON,
WS. - DNA polymerase associated with human hepatitis
B antigen. *J. Virol.*, 12:995-1005, 1973
- KATER, L.; VAN GORP, LHM. and BÖRST-EILERS, E. - Hepatitis:
intrahepatic expression of an antigen and immune
complexes in liver tissue. *Vox. Sang. Suppl.*
24:27-32, 1973
- KEZEM, J. - Hepatite por virus. Estudo de 156 casos. Tese,
Univ. Fed. Rio de Janeiro, 107p., 1975
- KEW, MC. - Hepatoma and HBV. pp.439-450. In *Viral Hepatitis*.
Edited by VYAS, GN.; COHEN, SN. and SCHMID, R.
Franklin Institute Press. San Francisco, California,
1978
- KHURD, MS. - Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis:
Possibility of another human hepatitis virus
distinct from post-transfusion non-A, non-B type.
Am. J. Med., 68:818-824, 1980
- KING, JW. - A clinical approach to hepatitis B. *Arch. Intern.*
Med., 142:925-928, 1982
- KOFF, RS.; PANNUTI, CS.; PEREIRA, MIG.; HANSSON, BG.; DIENSTAG, JL.;
ÁMATO NETO, V.; WONG, DC. and PURCELL, RH. - Hepatitis
A and non-A, non-B viral hepatitis in São Paulo, Brazil:
epidemiological clinical and laboratory comparisons in
hospitalized patients. *Hepatology*, 2:445-448, 1982

- KRUGMAN, S.; GILES, J. and HAMMOND, J. - Viral hepatitis type B (MS2 strain) studies on active immunization. JAMA, 217:41-45, 1971a
- KRUGMAN, S.; GILES, J. and HAMMOND, J. - Viral hepatitis type B (MS2 strain). Prevention with specific hepatitis B immune serum globulin. JAMA, 218:1665-1670, 1971b
- KRUGMAN, S.; GILES, J.P. - Viral hepatitis type B (MS-2-strain). Further observation on natural history and prevention. N.Engl. Med., 288:755-760, 1973
- KRUGMAN, S.; HOOFNAGLE, J.H.; GERETY, R.J.; KAPLAN, P.M. and GERIN, J.L. - Viral hepatitis, type B. DNA polymerase activity and antibody to hepatitis B core antigen. N.Engl. J. Med., 290:1331-1335, 1974
- KRUGMAN, S. - Hepatitis virus vaccines: present status. Yale J. Biol. Med., 55:375-381, 1982
- LE BOUVIER, G.L. - The heterogeneity of Australia antigen. J. Infect. Dis., 123:671-675, 1971
- LE BOUVIER, G.L. and WILLIAMS, A. - Serotypes of hepatitis B antigen (HB_sAg): The problem of "new" determinants as exemplified by "t". Am. J. Med. Sci., 270:165-171, 1975
- LEMON, S.M.; BROWN, C.D.; BROOKS, D.S.; SIMMS, T.E. and BANCROFT, W.H. - Specific immunoglobulin M response to hepatitis A virus determined by solid-phase radioimmunoassay. Infect. and Immun., 28:927-936, 1980
- LEVENE, C. and BLUMBERG, B.S. - Additional specificities of Australia antigen and the possible identification of hepatitis carriers. Nature, 221:195-196, 1969
- LOCARNINI, S.A.; FERRIS, A.A.; STOTT, A.C. and GUST, I.D. - Pitfalls in hepatitis A. Lancet, 2:1007, 1974

- LOCARNINI, SA.; COULEPIS, AG.; FERRIS, AA.; LEHMANN, NI. and GUST, ID. - Purification of hepatitis A virus from human feces. *Intervirology*, 10:300-308, 1978
- LOCARNINI, SA.; COULEPIS, AG.; STRATTON, AM.; KALDOR, J. and GUST, ID. - Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis A - specific immunoglobulin M. *J. Clin. Microbiol.*, 9:459-465, 1979
- MACNAB, GM.; ALEXANDER, JJ.; LECATSAS, G.; REY, EM. and URBANOWICZ, JM. - Hepatitis B surface antigen produced by a human hepatoma cell line. *Brit. J. Cancer*, 34:509-515, 1976
- MAGNIUS, LO.; and ESPMARK, JA. - New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants. *J. Immunol.*, 109:1017-1021, 1972a
- MAGNIUS, LO.; and ESPMARK, JA. - A new antigen complex co-occurring with Australia antigen. *Acta Path. Microbiol. Scand. Section B*, 80:335-337, 1972b
- MAGNIUS, LO. - Characterization of a new antigen-antibody system associated with hepatitis B. *Clin. Exp. Immunol.* 20:209-216, 1975
- MATHIESEN, LR.; FEINSTONE, SM.; PURCELL, RH. and WAGNER, JA. - Detection of hepatitis A antigen by immunofluorescence. *Inf. and Immun.* 18:524-530, 1977
- MATHIESEN, LR.; DRUCKER, J.; SØRENZ, D.; WAGNER, J.; GERETY, RJ. and PURCELL, RH. - Localization of hepatitis A antigen in marmoset organs during acute infection with hepatitis A virus. *J. Infect. Dis.*, 138:369-377, 1978

- MATHIESEN, LR.; FAUEHOLDT, LO.; MØLLER, AM.; ALDERSHVILE, J.; DIETRICHSON, O.; HAROT, F.; NIELSEN, JO.; SKINHØJ, JP. - Immunofluorescence studies for hepatitis A virus and hepatitis B surface and core antigen in liver biopsies from patients with acute viral hepatitis and the COPENHAGEN HEPATITIS ACUTA PROGRAMME. *Gastroenterology* 77:623-628, 1979
- MATHIESEN, LR.; HAROT, F.; DIETRICHSON, O.; PURCELL, RH.; SKINHØJ, P.; NIELSEN, JO.; ZOFFMANN, H.; and IVERSEN, K. - The role of acute hepatitis type A, B, non-A, non-B in the development of chronic active liver disease. *Scand. J. Gastroent.* 15:49-54, 1980
- MATHIESEN, LR.; SKINHØJ, PO.; NIELSEN, JO.; PURCELL, RH. - Hepatitis type A, B and non-A, non-B in fulminant hepatitis. *Gut*. 21:72-77, 1980
- McAULIFFE, VJ. and PURCELL, RH. - Current status of test for HBeAG and anti HBe., pg.161-171. In *Viral Hepatitis*. Edited by VYAS, GN.; COHEN, SN. and SCHMID, R. Franklin Institute Press. California, 1978
- MILLER, WJ.; PROVOST, PJ.; McALEER, WJ.; ITTENSÖHN, OL.; VILLAREJOS, VW. and HILLEMANN, MR. - Specific immune adherence assay for human hepatitis A antibody. Application to diagnosis and epidemiologic investigation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 149:254-261, 1975
- MØLLER, AM. and MATHIESEN, LR. - Detection of immunoglobulin M antibodies to hepatitis A virus by enzyme linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.*, 10:628-632, 1979
- MORI, Y.; OGATA, S.; ATA, S. and NAKANO, Y. - Virus-like particles associated with non-A, non-B hepatitis. *Lancet*, 2:318-1980
- MORI, Y.; OGATA, S.; ATA, S. and NAKANO, Y. - Detection of antigen antibody system associated with non-A, non-B hepatitis. *Lancet*, 1:98-99, 1981

- MORITSUGU, Y.; DIENSTAG, J.L.; VANDESUSO, J.; WONG, D.C.; WAGNER, J.; ROUTENBERG, J.A. and PURCELL, R.H. - Purification of hepatitis A antigen from feces and detection of antigen and antibody for immune adherence hemagglutination. *Infect. and Immun.*, 898-908, 1976
- MURPHY, B.; TABOR, E.; McAULIFFE, V.; WILLIAMS, A.; MAYNARD, J.; GERETY, R. and PURCELL, R. - Third component HBeAg/3, of hepatitis B e antigen system identified by three different double-diffusion techniques. *J. Clin. Microbiol.*, 8:349-350, 1978
- MUSHAHWAR, I.K.; McGRATH, L.C.; DRNEC, J. and OVERBY, L.R. - Radioimmunoassay for detection of hepatitis B e antigen and its antibody. Results of clinical evaluation. *Am. J. Clin. Path.*, 76:692-697, 1981
- NEURATH, A.R.; STEVENS, C.E.; STRIUK, N.; SZMUNESS, W.; OLESZKO, W.R. and HARLEY, E.J. - An antigen detected frequently in human sera with elevated levels of alanine aminotransferase a potential marker for non-A, non-B hepatitis. *J. Gen. Virol.*, 48:285-295, 1980
- NIELSEN, J.O.; DIETRICHSON, O.; ELLING, P. and CRISTOFERSEN, P. - Incidence and meaning of persistence of Australia antigen in patients with acute viral hepatitis: development of chronic hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, 285:1157-1160, 1971
- NIERMEIJER, P.; GIPS, C.H.; HUIZENGA, J.R.; RINGERS, J.; VERKERK, S.; HOUTHOFF, H.; HOUWEN, B.; SNIJDER, J. and NIELSEN, J.H. - IgM-anti-HBc as a marker of past hepatitis B infection. A longitudinal study over 5 years. *Acta Hepato-Gastroent.*, 25:360-364, 1978
- NORKRANS, G.; MAGNIUS, L. and IWARSON, S. - E antigen in acute hepatitis B. *Br. Med. J.*, 1:740-742, 1976

- NORKRANS, G.; FRØSNER, G. and IWARSON, S. - Determination of HBeAg by radioimmunoassay: prognostic implications in hepatitis B. *Scand.J.Gastroent.*, 14:289-293, 1979
- NORKRANS, G.; LINDEBERG, J.; FRØSNER, G.; HERMODSSON, S.; LUNDIN, P. and IWARSON, S. - Clearance of hepatitis B e antigen in chronic hepatitis B infection. *Scand. J.Gastroent.*, 17:383-387, 1982
- NOWOSLAWSKI, A.; KRACZYNSKI, K.; BRZOSKO, WJ. and MADALINSKI, K. - Tissue localization of Australia antigen immune complexes in acute and chronic hepatitis and liver cirrhosis. *Am.J.Path.*, 68:31-48, 1972
- NOWOSLAWSKI, A.; KRAWCZYNSKI, K.; NAZAREWICZ, T. and SLUSARCZYK, J. - Immunopathological aspects of hepatitis type B. *Am.J.Med.Sci.*, 270:229-239, 1975
- OHBAYASHI, A.; OKOCHI, K. and MAYUMI, M. - Familial clustering of asymptomatic carrier of Australia antigen in patients with chronic liver disease or primary liver cancer. *Gastroenterology*, 62:618-625, 1972
- OKADA, K.; KAMIYAMA, I.; INOMATA, M.; IMAI, M.; MIYAKAWA, Y. and MAYUMI, M. - E antigen and anti-e in the serum of asymptomatic carrier mother as indicator of positive and negative transmission of hepatitis B virus to their infants. *N.Engl.J.Med.*, 294:746-749, 1976
- OMATA, M.; AFROUDAKIS, A.; LIEW, CT.; ASHCAVAI, M. and PETERS, RL. - Comparison of serum hepatitis B surface antigen (HBsAg) and serum anticore with tissue HBsAg and hepatitis B core antigen (HBcAg). *Gastroenterology*, 75:1003-1009, 1978

- PARONETTO, F. and POPPER, H. - Aggravation of hepatic lesions in vivo localization of human complexes (Auer hepatitis). *Am. J. Pathol.*, 47:549-563, 1965
- PAIVA, LM.; KEZEM, J.; MIYAGUI, T. e BARRETO NETO, M. - Esteatose microvesicular como substrato de hepatite aguda grave. Provável relação com hepatite de Lábrea. *Arq. Bras. Med.*, 57:71-74, 1983
- PIAZZA, M.; GUADAGNINO, N.; ORLANDO, L. and PICCIOTTO, L. - Acute B viral hepatitis becomes fulminant after infection with hepatitis A virus. *Brit. Med. J.*, 284:1913-1914, 1982
- PAPAEVANGELOU, G.; DECKER, R.; CONTOYANNIS, P. and OVERBY, L. - Differencial serodiagnosis of sporadic acute viral hepatitis. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 161:322-325, 1979
- PERILLO, RP.; GELB, LD.; MILLIGAN, III.; WELLINGHOFF, E. and AACH, RD. - Discordant e antigen DNA polymerase activity an Dane particle responses in two patients representating and index case-contact case pair with hepatitis B virus infection. *J. Infect. Dis.*, 136:117-121, 1977
- PILLLOT, J. - Le diagnostic immunologic de l'hepatite B. *Ann. Biol. Clin.*, 35:1-17, 1977
- PRINCE, AM. - An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc. NAS.*, 814-821, 1968
- PRINCE, AM.; SZMUNESS, W.; WOODS, KR. and GRADY, GF. - Antibody against serum hepatitis antigen: prevalence and potencial use as immune serum globulin in prevention of serum hepatitis infection. *N. Engl. J. Med.*, 285:933-938, 1971

- PRINCE, AM.; GRADY, GF.; HAZZI, C.; BROTMAN, B.; KUHNS, WJ.; LEVINE, RW. and WILLIAM, ST. - Long-incubation post-transfusion hepatitis without serological evidence of exposure to hepatitis-B virus. *Lancet*, 2:241-6, 1974
- PRINCE, AM. - Nature of non-A, non-B hepatitis viruses. *Lancet*, 1:1181-1182, 1982
- PROVOST, PJ.; ITTELSOHN, OL.; VILLAREJOS, VM.; ARQUEDAS, G.; and HILLEMANN, MR. - Etiologic relationship of marmoset-propagated CR326 hepatitis A virus to hepatitis in man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 142:1257-1267, 1973
- PROVOST, PJ.; ITTELSOHN, OL.; VILLAREJOS, VM. and HILLEMANN, MR. - A specific complement fixation test for human hepatitis. A employing CR326 virus antigen. *Diagnosis and epidemiology* (38669). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 148: 962-969, 1975
- PROVOST, PJ.; WOLANSKI, BS.; MILLER, WJ.; ITTELSOHN, OL.; McALLER, WJ. and HILLEMANN, MR. - Physical, chemical morphologic dimensions of human hepatitis A virus strain CR326. *Proc. Soc. Exp. Med.*, 148:532-539, 1975
- PROVOST, PJ. and HILLEMANN, MR. - Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 159:201-203, 1978a
- PROVOST, PJ. and HILLEMANN, MR. - An inactivated A virus vaccine prepared from infected marmoset liver (40314). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 159:201-203, 1978b
- PURCELL, RH.; DIENSTAG, JL.; FEINSTONE, SM. and KAPIKIAN, AZ. - Relation of hepatitis A antigen to viral hepatitis. *Am. J. Med. Sci.*, 270:61-71, 1975
- PURCELL, RH.; ALTER, HJ. and DIENSTAG, JL. - Non-A, non-B hepatitis. *Yale J. Biol. Med.*, 49:243-250-1976

- PURCELL, PH.; WONG, DC.; MORITSUGU, Y.; DIENSTAG, JL.; ROUTENBERG, JA. and BOGGS, JD. - A microtiter solid-phase radioimmunoassay for hepatitis A antigen and antibody. *J. Immunol.*, 116:349-356, 1976
- RAKELA, J. and REDEKER, AG. - Chronic liver disease after acute non-A, non-B viral hepatitis. *Gastroenterology*, 77:1200-1202, 1979
- RAY, MB.; DESMET, VJ. - Distribution patterns of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in liver biopsies of hepatitis B patients. *Acta Gastroenterol. Belg.*, 39: 307-317, 1976
- REDECKER, AG. - Delta agent and hepatitis B. *Ann Int. Med.*, 98:542-543, 1983
- ROBINSON, WS. and GREENMAN, RL. - DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J. Virol.*, 13:1231-1236, 1974
- ROBINSON, WS. - The enigma of non-A, non-B hepatitis. *J. Infect. Dis.*, 145:387-395, 1982
- ROGGENDORF, M.; FRÖSNER, GG.; DEINHARDT, F. and SCHEID, R. - Comparison of solid phase test systems for demonstrating antibodies against hepatitis A virus (anti-HAV) of the IgM-class. *J. Med. Virol.* 5:47-62, 1980
- SCHULMAN, AN.; DIENSTAG, JL.; JACKSON, DR.; HOOFNAGLE, JH.; GERETY, RJ.; PURCELL, RH. and BARKER, LF. - Hepatitis A antigen particles in liver, bile and stool of chimpanzees. *J. Infect. Dis.*, 134:80-84, 1976

- SHEIKH, NE.; WOOLF, TL.; GALBRAITH, RM.; DEESTON, ALW.; DYMCK, IW.; WILLIAMS, R. - Antigen-antibody system as indicator of liver damage in patients with hepatitis B antigen. *Brit. Med. J.*, 4:252-253, 1975
- SHERLOCK, S.; FOX, RA.; NIAZI, SP. and SCHEUER, PJ. - Chronic liver disease and primary liver-cell cancer with hepatitis-associated (Australia) antigen in serum. *Lancet*, 1:1243-1247, 1970
- SHERLOCK, S. - Long incubation (virus B, HAA associated) hepatitis. *Progress report. Gut*, 23:307-1972
- SHERLOCK, S. - The association of "e" antigen and "e" antibody with type B virus hepatitis. *Biomedicine*, 24:283-285, 1976
- SHIKATA, T.; UZAWA, T.; YOSHIWARA, N.; AKATSUKA, T. - and YAMAZAKI, S. - Staining methods of Australia antigen plasmic inclusion bodies. *Japan J. Exp. Med.*, 44:25-36, 1974
- SHIKATA, T.; KARASAWA, T.; ABE, K.; UZAWA, T.; SUZUKI, H.; ODA, T.; IMAI, M.; MAYUMI, M. and MORITSUGU, Y. - Hepatitis B e antigen and infectivity of hepatitis B virus. *J. Infect. Dis.*, 136:571-576, 1977
- SHIKATA, T. - Pathology and pathogenesis of viral hepatitis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health.*, 9:171-176, 1978
- SHIRACHI, R.; TATEDA, A.; SHIRAISHI, H. and KIKUCHI, K. - Hepatitis "C" antigen in non-A, non-B post-transfusion hepatitis. *Lancet*, 2:853-856, 1978
- SIEGL, G. and FRÖSNER, GG. - Characterization and classification of virus particles associated with hepatitis A. I - Size, density and sedimentation. *J. Virol.*, 26:40-47, 1978a

- SIEGL, G. and FRÜSNER, GG. - Characterization and classification of particle associated with hepatitis A. II - Type and configuration of nucleic acid. *J. Virol.*, 26: 48-53, 1978b
- STOBO, JD. - Discussion of "cell-mediated immunity and liver disease. pp.275-276. In: *Viral Hepatitis*. Edited by VYAS, GN.; COHEN, SN. and SCHMID, R. Franklin Institute Press. San Francisco, California, 1978
- STORCH, GA.; BODICKY, C.; PARKER, M.; BLECKA, LJ. and AACH, RD. - Use of conventional and IgM specific radioimmunoassays for anti-hepatitis A antibody in an outbreak of hepatitis A. *Am. J. Med.*, 73:663-668 1982
- TABOR, E.; DRUKER, JA.; HOOFNAGLE, JH.; APPRIL, M.; GERETY, RJ.; SEEFF, LB.; JACKSON, DR.; BARKER, LF. and PINEDA-TAMONDONG, G. - Transmission of non-A, non-B hepatitis from man to chimpanzees. *Lancet*, 1:463-465, 1978
- TABOR, E.; KRUGMAN, S.; WEISS, EC. and GERETY, RJ. - Disappearance of hepatitis B surface antigen during an unusual case of fulminant hepatitis B. *Memo. H.*, 36-38 n° 3, 1982
- TABOR, E.; PONZETTO, A.; GERIN, JL. and GERETY, RJ. Does delta agent contribute to fulminant hepatitis? *Lancet*, 1:764-765, 1983
- TAKAHASHI, K.; IMAI, M.; TSUDA, F. and MAYUMI, M. - Association of Dane particles with e antigen the serum of asymptomatic carriers of hepatitis B surface antigen. *J. Immunol.*, 177:102-105, 1976
- TAKAHASHI, K.; AKAHANE, Y.; GOTANDA, T.; MISHIRO, T.; IMAI, M.; MIYAKAWA, Y. and MAYUMI, M. - Demonstration of hepatitis B e antigen in the core of Dane particles. *J. Immunol.* 122:275-279, 1978

- TAKAHASHI, K.; AKAHANE, Y.; GOTANDA, T.; MISHIRO, T.; IMAI, M.; MIYAKAWA, Y. and MAYUMI, M. - Demonstration of hepatitis B e antigen in the core of Dane particles. *J. Immunol.* 122:275-279, 1979
- THONSEN, P. and CLAUSEN, P. - Occurrence of hepatitis B. Surface antigen in a consecutive material of 1539 liver biopsies. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. A*, 91:71-75, 1983
- THORNTON, A.; TSISQUAYE, K. and ZUCKERMAN, A. J. - Studies on human hepatitis A virus in chimpanzees. *Br. J. Exp. Path.* 58:352-358, 1977
- TONG, M. J.; STEVENSON, D. and GORDON, I. - Correlation of e antigen, DNA polymerase activity and Dane particles in chronic benign and chronic active type B hepatitis infections. *J. Infect. Dis.*, 135:980-984, 1977
- TONG, M. J.; THURB, M.; RAKELA, J.; McPEAK, C.; EDWARDS, V. M. and MOSLEY, J. W. - Studies on the maternal-infant transmission of the viruses which cause acute hepatitis. *Gastroenterology*, 80:999-1004, 1981
- TREPO, C.; ROBERT, D.; MOTIN, J.; TREPO, D.; SEPETJIAN, M. and PRINCE, A. M. - Hepatitis B antigen (HBsAg) and antibodies (anti-HBs and anti-HBc) fulminant hepatitis pathogenic and prognostic significance. *Gut*, 17: 10-13, 1976
- TREPO, C.; VITVITSKI, L.; NEURATH, R.; HASHIMOTO, N.; SCHAEFER, R.; NEMOZ, G. and PRINCE, A. M. - Detection of e antigen by immunofluorescence in cytoplasm of HBsAg carriers. *Lancet*, 1:486-487, 1976

- TREPO, C.; HANTZ, O.; VITVITSKI, L.; CHEVALIER, P.; WILLIAMS, A.; LEMAIRE, J.M. and SEPETJIAN, M. - Heterogeneity and significance of HBeAg: characterization of a third specificity (e3) pg., 203-209. In: *Viral Hepatitis*. Edited by VYAS, G.N.; COHEN, S.N. and SCHMID, R. Franklin Institute Press. California, 1978
- TREVISAN, A.; REALDI, D.; ALBERTI, A. and NOVENTA, F. - Relationship between membrane bound immunoglobulin and viral antigens in liver cells from patients with hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*, 77:209-214, 1979
- VANDERVELDE, E.M. - Acute hepatitis: significance of antibody hepatitis B core antigen. *J. Clin. Pathol.*, 31:1140-1142, 1978
- VILLAREJOS, V.M.; VISONA, K.A. and EDUARTE, C.A. - Evidence for viral hepatitis other type A or B among persons in Costa Rica. *N. Engl. J. Med.*, 293:1350-1352, 1975
- WILLIAMS, A. and LE BOUVIER, G. - Heterogeneity and thermolability of "e". *Biblioteca haematologica* n° 42, 71-75, 1976
- WONG, M.L.; LEHMANN, N.I. and GUST, I.D. - Detection of hepatitis B surface antigen in the saliva of patients with acute hepatitis B, and chronic carriers. *Med. J. Aust.*, 2:52-5, 1976
- WOOLF, I.L.; SHEIKH, N.; CULLENS, H.; LEE, W.M.; EDDLESTON, A.L.W.F.; WILLIAMS, R. and ZUCKERMAN, A.J. - Enhanced HBsAb production in pathogenesis of fulminant viral hepatitis type B. *Brit. Med. J.*, 2:669-671, 1976
- YOSHIDA, C.F.T. - Comunicação pessoal, 1983

- YOSHIDA,H.; ITOH,Y.; SIMONETTI,JP.; TAKAHASHI,T.; MACHIDA,A.; MIYAKAWA,Y. and MAYUMI,M. - Demonstration of hepatitis B e antigen in hepatitis B core particles obtained from the nucleus of hepatocytes infected with hepatitis B virus. *J.Gen.Virol.*,42:513-519,1979
- YOSHIZAWA,H.; AKAHANE,Y.; ITOH,Y.; IWAKIRI,S.; KITAJIMA,K.; MORITA,M.; TANAKA,A.; NOJIRI,T.; SHIMIZU,M.; MIYAKAWA,Y. and MAZUMI,M. - Virus-like particles in a plasma fraction (fibrinogen) and in the circulation of apparently healthy blood donors capable of inducing non-A, non-B hepatitis in humans and chimpanzees. *Gastroenterology*,79:512-520,1980
- YOSHIZAWA,H.; ITOH,Y.; IWAKIRIS, ; TSUDA,D.; NAKANO,S.; MIYAKAWA,Y. and MAYUMI,M. - Diagnosis of type A hepatitis by fecal IgA antibody against hepatitis A antigen. *Gastroenterology*, 78:114-128,1980
- ZUCKERMAN,AJ. - Tissue and organ culture studies of hepatitis B virus. *Am.J.Med.Sci.*,270:197-204,1975